

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar por el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias**

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE DISACÁRIDOS, DETERGENTES Y AMIDAS A UN
DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA AL
DESCONGELADO EN FELINOS**

Autor: MV Bonauro María Candela.

Director: MV, DCsV, Stornelli, María Alejandra.

Codirector: MV, DCsV, Nuñez Favre Romina.

**Lugar de Trabajo: Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal,
Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de La Plata.**

Miembros Titulares del Jurado:

MV, DCsV, Bact, Arauz María Sandra

MV, MSc, PhD, Miragaya Marcelo

MV, Dr, Wanke Magdalena

La Plata, Buenos Aires, 22 de Marzo 2016

1
2
3
4
5
6
7
8
9

DEDICATORIA

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

A mi familia, mi pareja y Luly

Que me han acompañado en todas la desiciones de mi vida, han festejado mis logros y me han apoyado en momentos difíciles. Han tolerado y alimentado este espíritu inquieto que siempre corre tras nuevos sueños. Estas personas que han inspirado y sido ejemplo para formar mi ser. Mi Luly, que no me alcanzan las palabras para describir el sentido y la alegría que le has dado a mis días, cuando te encontré no sabía que hacer con vos y hoy no sabría que hacer sin tu compañía.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a mi directora de tesis la Dra. María Alejandra Stornelli, que confió en mí, me brindó toda su sabiduría y experiencia científica. Agradecer al Dr. Rodolfo Luzbel de la Sota por permitirme trabajar en su cátedra. A mis compañeros del Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal, por su ayuda, leyendo, opinando y corrigiendo mi tesis; por haber sido parte de todos estos años. En especial a mis compañeras de pequeños. A Romina que me enseñó y guío en el inicio de mi investigación. A Sara que me ha demostrado mucho cariño y a quien admiro. A Carla que es quien más me aguanta todos los días a su lado, que me ayudó con el análisis estadístico y los gráficos en el momento de mayor presión, me aconsejó y me escuchó incansable cantidad de veces.

Agradezco a la Dra. Susana Jurado y a Roxana por su apoyo, cariño y continua colaboración en el procesado y evaluación de las muestras de Microscopía Electrónica.

Al centro de zoonosis de La Plata, en especial a Julieta Celestre por la predisposición y colaboración con las muestras de los animales incluidos en el estudio.

Al Laboratorio de Inmunoparasitología y Microbiología y todos sus integrantes que me facilitaron el uso del Microscopio de Fluorescencia y que más de una vez dejaron de realizar sus tareas para brindarme un espacio.

A los donantes, nuestra colonia que me han hecho difícil la obtención de muestras, pero me han ayudado a perder el estrés en los momentos críticos.

A mi equipo de salvamento que me cambió el destino, me agregó un sentido y me llenó de objetivos. Son mi cable al agua, mi mayor locura y mi mejor pasión. En especial al Tomba, mi hermano acuático.

A mis grandes amigas, esas hermanas que me dió la vida, Georgina, Eva y Xime.

1 A todos mis amigos y amigas de la facu, del equipo y de la vida que han transitado
2 parte de este camino (Sofi, Pau, Aye, Chechu, Coty, Fla, Fran, Santi, Seba, Toto).

3 A mis suegros y familia política, que me han brindado un lugar, agradezco todos los
4 días tenerlos en mi vida. A mis sobrinos Vale, Joaco; mis dos soles Francisco y Santiago.

5 A mi mamá y mi papá, a mis hermanos Leandro y Exequiel, mi cuñada Gi, que son mi
6 gran sostén, los que siempre me ayudaron a nunca bajar los brazos, a buscar sobre todo la
7 felicidad, los amo mucho. Mi compañero de vida por su apoyo incondicional y sus grandes
8 demostraciones de amor, gracias por haber aparecido en mi vida, Manu.

9 A mi más fiel compañera, quien me enseñó a pensar más en otro que en uno mismo,
10 quien a pesar de no decir una palabra me ha expresado su inmenso amor con sus miradas, su
11 fidelidad, sus locuras y alegrías, la dueña de mi corazón, mi perra Luly.

12 Agradezco a la UNLP por haberme permitido ser lo que una vez soñé y realizar mis
13 estudios de grado y postgrado en la Facultad de Veterinaria.

14 Agradezco a la CIC y CONICET por haberme becado para poder dedicarme a realizar
15 la tesis.

16 A los jurados por sus aportes y correcciones.

ÍNDICE

1		
2		PÁGINA
3	DEDICATORIA	II
4	AGRADECIMIENTOS	IV
5	LISTA DE ABREVIATURAS	IX
6	LISTA DE FIGURAS	XII
7	LISTA DE TABLAS	XV
8	LISTA DE PUBLICACIONES	XVI
9	RESUMEN.....	XVIII
10	SUMMARY	XIX
11	CAPÍTULOS	
12	I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
13	II. EFECTO DE LA ADICIÓN DE TREALOSA SIN VARIAR LA OSMOLALIDAD DE	
14	UN DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA	
15	POST DESCONGELACIÓN EN FELINOS	
16	Introducción.....	22
17	Materiales y Métodos	26
18	Análisis estadístico	30
19	Marco bioético del uso de animales	30
20	Resultados	31
21	Discusión y conclusiones	36
22		

1	III. EFECTO DE LA ADICIÓN DE DIMETILFORMAMIDA AL DILUYENTE EN	
2	REEMPLAZO DE PARTE DEL GLICEROL SOBRE LA SUPERVIVENCIA	
3	ESPERMÁTICA POST DESCONGELACIÓN EN FELINOS	
4	Introducción.....	41
5	Materiales y Métodos	44
6	Análisis estadístico	46
7	Marco bioético del uso de animales	46
8	Resultados	47
9	Discusión y conclusiones	52
10		
11	IV. EFECTO DE LA ADICIÓN DE DODECIL SULFATO DE SODIO A UN	
12	DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA POST	
13	DESCONGELACIÓN EN FELINOS	
14	Introducción.....	56
15	Materiales y Métodos	59
16	Análisis estadístico	62
17	Marco bioético del uso de animales	62
18	Resultados	62
19	Discusión y conclusiones	67
20		
21	V. EFECTO DE LA ADICIÓN DE TREALOSA Y DODECIL SULFATO DE SODIO A	
22	UN DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA	
23	POST DESCONGELACIÓN EN FELINOS	
24	Introducción.....	71

1	Materiales y Métodos	74
2	Análisis estadístico	76
3	Marco bioético del uso de animales	77
4	Resultados	77
5	Discusión y conclusiones	82
6		
7	VI. ESTUDIOS ULTRAMICROSCÓPICOS DE LOS ESPERMATOZOIDES FELINOS	
8	CONGELADOS-DESCONGELADOS	
9	Introducción.....	84
10	Materiales y Métodos	88
11	Análisis estadístico	89
12	Marco bioético del uso de animales	89
13	Resultados	89
14	Discusión y conclusiones	97
15		
16	CONCLUSIONES GENERALES	102
17		
18	BIBLIOGRAFÍA	103
19		
20	BIOGRAFÍA PERSONAL	128
21		

LISTA DE ABREVIATURAS

AI	Acrosomas Intactos
ANI	Animal
°C	Grados Centígrados
Ca ⁺⁺	Calcio
CE	Concentración Espermática
CFL	Ciclo Fotoperíodo Largo
CMM	Cuadrados Medios Mínimos
CFC	Ciclo Fotoperíodo Corto
CSP	Cantidad suficiente para
DIC	Diacetato de Carboxifluoresceína
DIL	Diluyente
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E	Espermatozoide
EE	Espermatozoides Epididimales
EF	Espermatozoides Felinos
EPI	Epidídimo
EY	Espermatozoides Eyaculados
g	Gramos
GLY	Glicerol
IA	Inseminación Artificial

IC	Índice de congelabilidad
ICSI	Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides
IM	Integridad de Membrana
i.m.	Intramuscular
IT	Intratubal
IU	Intrauterina
IV	Intravaginal
Kg	Kilogramos
ME	Microscopio Electrónico
MEB	Microscopio Electrónico de Barrido
MET	Microscopio Electrónico de Transmisión
Mg	Miligramos
MI	Motilidad Individual
ml	Mililitros
MO	Microscopio Óptico
mOsm/L	Miliosmoles por litro
nm	Nanómetros
OEP	Orvus ES Paste
rpm	Revoluciones por minuto
SF	Solución Fisiológica
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TREA	Trealosa
TRIS	Tris Base

v Voltios

VA Vagina Artificial

VI Vigor

VS. Versus

w Watts

YP Yoduro de Propideo

μL Microlitros

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
2.1. Pruebas de contrastación del material seminal <i>in vitro</i>	28
2.2. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre espermatozoides epididmales frescos y congelados-descongelados	32
2.3. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre espermatozoides epididmales frescos y congelados-descongelados con TRIS y con TREA	33
2.4. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre semen fresco y congelado-descongelado	34
2.5. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre semen fresco y congelado-descongelado con TRIS y con TREA	35
3.1. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre espermatozoides epididmales frescos y congelados-descongelados	48
3.2. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre espermatozoides epididmales frescos y congelados-descongelados con TRIS y con DMF	49
3.3. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre semen fresco y congelado-descongelado	50

1	3.4. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de	
2	membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre semen fresco y	
3	congelado-descongelado con TRIS y con DMF	51
4	4.1. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de	
5	membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre espermatozoides	
6	epididimales frescos y congelados-descongelados	63
7	4.2. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de	
8	membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre espermatozoides	
9	epididimales frescos y congelados-descongelados con TRIS y con SDS.....	64
10	4.3. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de	
11	membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre semen fresco y	
12	congelado-descongelado	65
13	4.4. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de	
14	membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre semen fresco y	
15	congelado-descongelado con TRIS y con SDS	66
16	5.1. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de	
17	membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre espermatozoides	
18	epididimales frescos y congelados-descongelados	78
19	5.2. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de	
20	membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre espermatozoides	
21	epididimales frescos y congelados-descongelados con TRIS y con TREA+SDS.....	79
22	5.3. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de	
23	membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre semen fresco y	
24	congelado-descongelado	80

1	5.4. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual, vigor, porcentaje de	
2	membranas íntegras y porcentaje de acrosomas intactos entre semen fresco y	
3	congelado-descongelado con TRIS y con TREA+SDS.....	81
4	6.1. Evaluacion ultramicroscopica de espermatozoides frescos	91
5	6.2. Evaluacion ultramicroscopica de espermatozoides congelados-descongelados.....	92

1		
2	TABLA	PÁGINA
3	6.1. Porcentaje de cabezas espermáticas normales en espermatozoides epididimales	
4	frescos y congelados-descongelados en cada uno de los experimentos.....	93
5	6.2. Porcentaje de colas espermáticas normales en espermatozoides epididimales frescos y	
6	congelados-descongelados en cada uno de los experimentos	93
7	6.3. Porcentaje de daños espermáticos observados en las cabezas de los espermatozoides	
8	epididimales frescos y congelados-descongelados	95
9	6.4. Porcentaje de daños espermáticos observados en las colas de los espermatozoides	
10	epididimales frescos y congelados-descongelados	96
11		

1

LISTA DE PUBLICACIONES

2 **Trabajos en revistas con referato**

- 3 1. Bonaura MC; Jurado S; Nuñez Favre R; García Mitacek; Sarmiento P; Stornelli MA.
 4 Anormalidades espermáticas en el felino doméstico (*Felis silvestris catus*). ACTA
 5 Microscópica, Colombia, Cartagena. Vol. 23, No. 3, 2014 p. 161-167.
- 6 2. Bonaura MC; Jurado S; Praderio R; Nuñez Favre R; Tittarelli C; Stornelli MC;
 7 Stornelli MA. Alteraciones ultramicroscópicas observadas en espermatozoides felinos
 8 (*Felis catus*) congelados-descongelados. Sociedad de Ciencias Morfológicas 2013 p.
 9 25-33.
- 10 3. Bonaura, MC; Nuñez Favre, R; Praderio, RG; Tittarelli CM; García Mitacek MC;
 11 Stornelli, MA. Efecto de la adición de dimetilformamida al diluyente tris base sobre la
 12 supervivencia del semen felino congelado-descongelado. Analecta Vet 2014 p.14-19.

13 **Comunicaciones cortas publicadas en revistas**

- 14 1. Bonaura MC, Stornelli MA. Criopreservación de espermatozoides epididimales en el
 15 felino doméstico. Analecta Vet 2014. Vol 34 (1-2) pp 52.

16 **Resúmenes en congresos nacionales e internacionales**

- 17 1. Bonaura MC; Núñez Favre R; Mansilla Hermann D; Tittarelli C; Stornelli MA. Efecto
 18 de la adición de trealosa a un diluyente tris base sobre la supervivencia espermática al
 19 descongelado en felinos-Jornada de Jóvenes Investigadores-Facultad de Ciencias
 20 Veterinarias, UBA. 16 y 17 de Junio de 2011. Resolución (CD) N|558/10.
- 21 2. Bonaura MC; Praderio R; Tittarelli MC; Nuñez Favre R; Stornelli MA. Efecto de la
 22 adición de Dodecil Sulfato de Sodio a un diluyente Tris base sobre la supervivencia de
 23 espermatozoides epididimales post descongelación. XIII Jornadas de Divulgación
 24 Técnico Científicas, FCV-UNR. Segunda Reunión Conjunta UNL-UNR. 6 de Agosto
 25 de 2012 p. 51-52.
- 26 3. Bonaura MC; Praderio R; Nuñez Favre R; Tittarelli CM; Stornelli MA. Efecto de la
 27 adición de Dimetilformamida a un diluyente Tris base sobre la supervivencia de
 28 espermatozoides epididimales felinos pos descongelado. Terceras Jornadas
 29 Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal.
 30 Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. 15 y 16 de Noviembre de 2012. Resolución
 31 (CD) N: 1637/120.
- 32
 33 4. Bonaura, MC; Praderio R; Nuñez Favre R; Tittarelli CM; Stornelli MC; Stornelli MA.
 34 Efecto de la adición de trealosa a un diluyente tris base sobre la supervivencia de
 35 espermatozoides epididimales al descongelado en el Felino doméstico (*Felis catus*).
 36 XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas 2013. Facultad de Ciencias
 37 Veterinarias, UNR Jornada latinoamericana p. 61-62.

38

- 1 5. Bonaure MC; Jurado S; Praderio R; Nuñez Favre R; Tittarelli C; Stornelli MC;
2 Stornelli MA Alteraciones ultramicroscópicas observadas en espermatozoides felinos
3 (*Felis catus*) congelados-descongelados. XV Congreso de Ciencias Morfológicas y 12°
4 Jornada de Educación. Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. 29 y 30 de
5 agosto de 2013. Facultad de Ciencias Médicas.
- 6 6. Bonaure MC, Stornelli MA. Ultramicroscopía de Espermatozoides Felinos
7 Criopreservados. "1° Congreso Internacional Científico/Tecnológico de la Provincia
8 de Buenos Aires. 19 y 20 de Septiembre de 2013. Ciudad de La Plata, Buenos Aires.
- 9 7. Bonaure MC; Jurado S; Nuñez Favre R; García Mitacek; Sarmiento P; Stornelli MA.
10 Anormalidades espermáticas en el felino doméstico (*Felis silvestris catus*). XII
11 Congreso Interamericano de Microscopía (CIASEM). Comité Interamericano de
12 Sociedades de Microscopía (CIASEM) y la Asociación Colombiana de Microscopía
13 (ASOCM) Colombia, Cartagena. 28 y 29 de Septiembre de 2013.
- 14 8. Bonaure MC; Camargo LS; Nuñez Favre R; Souza FF; García MF; Stornelli MC;
15 Stornelli MA. Efecto de la adición de trealosa, dodecilsulfato de sodio a un diluyente
16 tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales de felino doméstico
17 (*Felis catus*) al descongelado. XV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas.
18 Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR Jornada latinoamericana. 2014, pp.45-46.
- 19 9. Bonaure M; Jurado S; Peralta R; Praderio R; Nuñez Favre R; Stornelli MA.
20 "Alteraciones ultramicroscópicas observadas en espermatozoides epididimales felinos
21 (*Felis silvestris catus*) congelados-descongelados en un diluyente tris base con el
22 agregado de dodecil sulfato de sodio". XVI Congreso y 13^{avas} Jornadas de Educación
23 de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. Septiembre de 2014, pp. 34.
- 24 10. Bonaure MC; Jurado S; Nuñez Favre R; Stornelli MC; Stornelli MA. Alteraciones
25 Ultramicroscópicas observadas en Espermatozoides Epididimales Felinos (*Felis*
26 *Silvestris Catus*) Congelados-Descongelados en un Diluyentes Tris con el agregado de
27 Trealosa. XVI Jornadas de Divulgación Técnico Científicas 2015. Facultad de
28 Ciencias Veterinarias, UNR Jornada latinoamericana.
- 29 11. Bonaure MC; Jurado S; García MF; Stornelli MA. Alteraciones ultramicroscópicas
30 observadas en espermatozoides epididimales felinos (*Felis silvestris catus*)
31 congelados-descongelados en un diluyente Tris base con el agregado de trealosa y
32 dodecil sulfato de sodio. Sociedad de Ciencias Morfológicas, Facultad de Ciencias
33 Médicas de la UNLP. 2015. P. 16.

1 **TÍTULO**

2 Efecto de la adición de disacáridos, detergentes y amidas a un diluyente tris base
3 sobre la supervivencia espermática al descongelado en felinos.

5 **PALABRAS CLAVES**

6 Felino, espermatozoides, criopreservación, diluyentes, ultramicroscopía

8 **RESUMEN**

10 Los espermatozoides de la cola epididimal pueden ser recuperados, congelados y
11 almacenados para su posterior uso, es una biotecnología reproductiva de gran importancia
12 para ser utilizada en animales en vías de extinción. El objetivo de este trabajo de tesis fue
13 estudiar diferentes modificaciones en los protocolos de congelación de semen felino con el fin de
14 introducir mejoras para aumentar la supervivencia espermática al descongelado. La hipótesis fue
15 que la incorporación de disacáridos, detergentes y amidas a un diluyente tris base provocará
16 un efecto benéfico en la viabilidad espermática al descongelado. El trabajo de tesis se dividió
17 en nueve experimentos. Se diseñaron 8 experimentos con el fin de evaluar el efecto sobre la
18 supervivencia espermática al descongelado de la adición de dimetilformamida, SDS, trealosa
19 o una combinación de estos componentes a un diluyente tris base. Se diseñó un experimento
20 en el cual se realizaron estudios ultramicroscópicos con el fin de estudiar el impacto protector
21 de los diluyentes sobre la célula espermática.

22 En los resultados de los experimentos 1-8 del plan podemos observar que con el agregado de
23 disacáridos o amidas al diluyente Tris base no se mejoró la congelabilidad de los
24 espermatozoides felinos. Sin embargo, se observó un efecto protector sobre los
25 espermatozoides al agregar un detergente y al combinar un detergente y un disacárido al
26 diluyente de congelación. En el experimento dirigido a estudiar la ultramicroscopía de los
27 espermatozoides criopreservados, se observaron los daños ultramicroscópicos generados
28 durante el proceso de congelación-descongelación en los espermatozoides felinos. Podemos
29 concluir que en felinos, el agregado de detergente solo o en combinación con disacáridos al
30 DIL Tris base mejora la viabilidad espermática al descongelado. Así mismo el estudio
31 ultramicroscopico permitió cuantificar y localizar los daños ocurridos durante el proceso de
32 congelación-descongelación.

1 **TITLE**

2 Effect of the addition of disaccharides, detergents and amides in a Tris based
3 extender on survival of frozen-thawed sperm in cats.

4

5 **KEY WORDS**

6 Cat, sperm, cryopreservation, extender, ultramicroscopy

7

8 **SUMMARY**

9

10 The recovery, freezing and storage of spermatozoa from the cauda of the epididymis is an
11 important reproductive biotechnology available for use in endangered species. The aim of this
12 dissertation was to study different extenders used in freezing feline semen to improve frozen-
13 thawed sperm survival. The hypothesis was that the addition of disaccharides, detergents and
14 amides in a Tris base extender will improve frozen-thawed sperm viability. This work is
15 divided into nine experiments. The first eight experiments were performed to study the effect
16 of Dimethylformamide, SDS, Trehalose or a combination of these components on a Tris base
17 extender on frozen-thawed sperm survival. The last experiment, ultramicroscopic studies were
18 performed to study the protective impact of the extender on frozen-thawed spermatozoa.

19 The results from the first eight experiments show that disaccharides or amides added to Tris
20 base extender does not improve sperm viability in frozen-thawed cat semen. However, the
21 addition of detergent or the combination of detergent with a disaccharide improved sperm
22 viability. The results from the last experiment pinpointed where damage occurred in frozen-
23 thawed sperm. We can conclude that in felines, adding detergent alone or in combination with
24 the disaccharide improves sperm viability in frozen-thawed semen. Also, ultramicroscopic
25 studies showed the amount and location of damage in frozen-thawed semen.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

El felino domestico (*Felis catus*) y los caninos (*Canis familiaris*) son animales de compañía en los cuales la aplicación de biotecnologías reproductivas no ha alcanzado el grado de desarrollo ocurrido en los animales de producción.

En la actualidad son muchas las especies de felinos salvajes que se encuentran amenazadas o en vías de extinción. Esto se debe por un lado a la caza indiscriminada, y por otro a la pérdida de su hábitat (Díaz y Ojeda, 2000; Díaz y Ojeda, 2012; Jiménez Vaquero, 2013). Los felinos domésticos son utilizados como modelo experimental de felinos silvestres debido a su relación filogenética. El conocimiento sobre la fisiología reproductiva felina ha mejorado el desarrollo de técnicas que son aplicables a felinos no domésticos (Luvoni, 2006; Silva y col., 2000; Rodrigues da Paz, 2012; Vargas y col., 2007; Ptaszynska, 2007; Axner, 2008). Es así que los conocimientos sobre criopreservación de espermatozoides de felinos domésticos pueden ser de suma utilidad en félidos silvestres en vías de extinción ya que permiten, aumentar sus posibilidades de preservación (Pukazhenthí y col., 2006; Díaz y Ojeda, 2000; Díaz y Ojeda, 2012). Las biotecnologías reproductivas usadas en animales domésticos, han sido implementadas en animales silvestres con el fin de ser utilizadas en zoológicos, reservas o parques y preservar así especies amenazadas (Comizzoli y col., 2000; Dresser y col., 1986). La expansión de biotecnologías reproductivas con el fin de promover la diversidad genética en poblaciones reducidas se ha convertido en una necesidad. La recuperación de espermatozoides epididimales (EE) y criopreservación espermática son herramientas de gran potencial para rescatar material genético. Es así que la recuperación espermática epididimal ofrece un material sumamente valioso a la hora de conservar material

1 genético de un individuo que ha sufrido muerte súbita o debe someterse a orquiectomía.
2 Probablemente la principal ventaja de la recuperación espermática epididimal es que permite
3 recolectar espermatozoides (E) maduros y fértiles que podrán ser criopreservados y
4 almacenados para su posterior uso extendiendo, así la vida reproductiva de un individuo. Este
5 hecho toma especial importancia en animales en vías de extinción. En la Argentina dentro de
6 los félidos silvestres amenazados se encuentran el Yaguareté (*Panthera onca*), Gato andino
7 (*Oreailurus jacobita*), Ocelote o gato onza (*Leopardus pardalis*) y Gato del pajonal
8 (*Leopardus calacalo*; Díaz y Ojeda, 2000; Díaz y Ojeda, 2012). Los esfuerzos realizados para
9 preservar estos félidos silvestres en vías de extinción se sumarían al esfuerzo mundial para
10 evitar las pérdidas de especies en el planeta.

11 Los espermatozoides felinos pueden ser recolectados mediante electroeyaculación,
12 utilizando una vagina artificial (VA), por medio de sondaje uretral y recuperado epididimal
13 (Sojka y col., 1970; Zambelli y Cunto, 2006; Stornelli MC y Stornelli MA, 2002; Stornelli,
14 MA, 2007a b; Hay y Goodrowe, 1993; Axner y Linde-Forsberg, 1998; Tittarelli y col., 2006;
15 Platz y col., 1978; Seager, 1976; Pineda y Dooley, 1984; Zambelli y col., 2010a; Fiellers y
16 col., 2010). Si bien el método de elección es la electroeyaculación hay situaciones en las que
17 el único método posible es el recuperado epididimal, por ejemplo ante la muerte repentina de
18 un animal (ANI). Los espermatozoides deben ser recuperados de la cola epididimal y
19 procesados lo más rápido posible luego de la obtención del epidídimo. Este hecho permite
20 obtener una gran cantidad de espermatozoides viables (Hay y Goodrowe, 1993; Axner y
21 Linde-Forsberg, 1998; Tittarelli y col., 2006). Sin embargo si la obtención inmediata de
22 espermatozoides de la cola epididimal no es posible, el almacenado del órgano bajo ciertas
23 condiciones permite obtener espermatozoides viables (Luvoni, 2006; Tittarelli y col., 2006;
24 Tittarelli y col., 2012; Yu y Leibo, 2002; Harris y col., 2001).

1 Luego de su recolección, los EF pueden ser preservados mediante la adición de un
2 diluyente adecuado y su inmersión en nitrógeno líquido (criopreservación). El diluyente debe
3 permitir obtener altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e
4 integridad acrosómica luego del proceso de congelación-descongelación, de esta manera
5 conseguir altas tasas de fertilidad *in vivo*. Para cumplir con estos objetivos el diluyente necesita
6 contener azúcares como fuente de energía, sustancias buffer que controlen los cambios de pH,
7 antibióticos que eviten el crecimiento bacteriano y crioprotectores que reduzcan la posibilidad
8 de daño de los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación
9 (Concannon y Battista, 1989). Mediante la criopreservación, es posible detener el proceso que
10 sufrir el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo
11 potencialmente fértil (Watson, 1995). En algunas especies la conservación de semen es
12 exitosa, sin embargo en otras esta aplicación es problemática. La pobre supervivencia
13 espermática representa uno de los mayores aspectos del problema (Holt, 2000). La
14 criopreservación requiere el refrigerado, equilibrado y empaquetado de la muestra. El
15 enfriado, congelado y descongelado son eventos que producen estrés sobre la célula
16 espermática, por lo tanto los espermatozoides criopreservados poseen menor capacidad
17 fecundante en comparación con los espermatozoides frescos (Watson, 1995).

18 En 1993 White postuló que en el eyaculado los espermatozoides interactúan con
19 componentes del fluido seminal, que modifican la funcionalidad espermática lo cual puede
20 cambiar las propiedades de la membrana espermática y la respuesta a diferentes tratamientos
21 (White, 1993). El plasma seminal contiene factores que son benéficos en algunas funciones
22 espermáticas como motilidad, capacitación, reacción acrosómica, viabilidad y/o interacción
23 espermatozoide-ovocito. Sin embargo estos factores pueden ser dañinos especialmente en la
24 preservación de los espermatozoides, incluyendo la criopreservación (Manjunath y Therien,

1 2002; Bergeron y Manjunath, 2006). Es así que su presencia ha sido asociada con alta
2 sensibilidad al shock de frío en porcinos (Pursel y col., 1972). En contraposición, se observó
3 que su remoción no afectó la viabilidad al descongelado en ovinos (Salamon y col., 1973). Se
4 puede decir que el plasma seminal contiene factores que son benéficos y/o perjudiciales a la
5 función y/o al almacenado. La naturaleza y característica de esos factores no se conoce en su
6 totalidad (Manjunath y Therien, 2002). Recientemente se ha comunicado que en el felino
7 doméstico altas concentraciones de colesterol y triglicéridos en el plasma seminal están
8 relacionadas con una mejor calidad seminal (García y col., 2013). Al compararse
9 espermatozoides de eyaculado con espermatozoides de la cola del epidídimo se ha observado
10 que no existen diferencias en la calidad de los espermatozoides frescos o luego de la
11 congelación (Tebet y col., 2006; Luvoni, 2006). Algunos trabajos han mostrado que según el
12 método de recolección pueden variar el volumen y concentración de espermatozoides
13 obtenidos, así como también algunas anormalidades espermáticas, observándose mayor
14 cuantía de morfoanomalías en los espermatozoides de origen epididimal (Axner y col., 1998;
15 Villaverde y col., 2006; Pukazenthi y col., 2002).

16 La criopreservación de espermatozoides tanto seminales como epididimales y su
17 posterior utilización, mediante implementación de distintas biotecnologías como lo son la
18 inseminación artificial (IA) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI),
19 permitiría gracias al uso de material genético de gran valor, conservar la biodiversidad de las
20 poblaciones y evitar la extinción de algunas especies amenazadas. La IA con espermatozoides
21 criopreservados puede ser útil cuando la hembra y el macho se encuentran en lugares distantes
22 o cuando el macho ya no está disponible para el servicio natural. Luego de la primer
23 comunicación realizada por Platz en 1978, de nacimientos logrados mediante IA con semen
24 felino congelado, se han realizado variados estudios sobre congelación de semen e IA

1 utilizando semen criopreservado (Platz y col., 1978; Axner y col., 2004; Hermansson y
2 Axner, 2007; Siemieniuch y Dubiel, 2007; Zambelli y col., 2002). El interés por el
3 conocimiento de las diferentes biotecnologías reproductivas en felinos ha ido aumentando y
4 ha impulsado el desarrollo e implementación de las mismas.

5 La IA es una biotecnología reproductiva que aún no se ha incorporado a la práctica
6 diaria en felinos así como ocurre en los caninos u otras especies de producción. En el felino
7 esta técnica se ha implementado frecuentemente en trabajos de investigación pero se utiliza
8 ocasionalmente en los programas reproductivos. Las particularidades de la fisiología
9 reproductiva, así como conductuales de los felinos tales como agresividad, ovulación
10 inducida, estacionalidad reproductiva, grandes variaciones individuales en la calidad de
11 semen entre machos, volumen seminal escaso y alto porcentaje de espermatozoides
12 anormales; son algunas de las problemáticas a enfrentar al momento de pensar en la
13 aplicación de esta biotecnología en el felino.

14 La hembra felina posee ovulación inducida por el coito, sin embargo, se ha comunicado
15 que un porcentaje (alrededor del 35%) ovulan espontáneamente (Johnston y col., 2001). Por
16 lo tanto, en ausencia de estímulo coital es necesario inducir la ovulación artificialmente antes
17 de la realización de la IA (Axner, 2008). Si la gata es dócil puede realizarse la inseminación
18 sin necesidad de sedación. Si los animales son agresivos puede necesitarse sedación o
19 anestesia. Existen diferentes protocolos de IA según el lugar de deposición de semen
20 (intravaginal, IV; intrauterina, IU; intratubal, IT). Así mismo esta técnica puede realizarse con
21 semen fresco o conservado (refrigerado o congelado). Las primeras preñeces obtenidas
22 mediante IA en felinos fueron realizadas en la década del 70' (Sojka y col., 1970; Platz y col.,
23 1978). Recién 30 años después, en 2000, se retomaron los estudios de IA en la hembra felina,
24 realizándose el depósito de semen en vagina tanto con semen fresco como criopreservado

1 (Tanaka y col., 2000; Tsuitsui y col., 2000a b). Se ha comprobado que la dosis inseminante
2 debe ser mayor cuando se insemina con espermatozoides criopreservados en comparación con
3 la dosis utilizada mediante IA con semen fresco (Tsuitsui y col., 2000a b). Las primeras IA
4 uterinas fueron realizadas quirúrgicamente, más tarde se implementó la canulación del cuello
5 uterino (Zambelli y col., 2004). En 2012, se realizó la IA oviductal por laparoscopia
6 obteniéndose preñeces con la utilización de bajas cantidades de espermatozoides (Lambo y
7 col., 2012; Swanson, 2012). Esta técnica es ventajosa por no ser quirúrgica y requerir un bajo
8 número de espermatozoides. El primer nacimiento ocurrido luego de la inseminación con EE
9 criopreservados fue obtenido mediante IA IU unilateral logrando una tasa de preñez de 27,3%
10 (Tsuitsui y col., 2003).

11 Las primeras inseminaciones realizadas con semen criopreservado presentaron bajas
12 tasas de preñez (Platz y col., 1978; Tsuitsui, 2006). Este hecho, pudo haberse debido por un
13 lado a las características fisiológicas de la hembra felina y por otro lado a que no se ha
14 logrado un protocolo óptimo para la congelación de EF. Se ha conseguido mejorar el
15 porcentaje de preñez obtenido mediante IA con semen congelado-descongelado (Chatdarong
16 y col., 2007; Axner, 2008; Tsuitsui y col., 2011; Toyonaga y col., 2011; Lambo y col., 2012).
17 Sin embargo, la evaluación de la madurez folicular, de diferentes protocolos de inducción de
18 ovulación, y de protocolos de IA; así como el estudio de la influencia de diferentes
19 crioprotectores sobre la supervivencia al descongelado de EE y eyaculados felinos congelados
20 permitirán optimizar esta biotecnología.

21 Varios protocolos de congelación de semen han sido desarrollados en la última década
22 con el objetivo de minimizar los daños celulares asociados a la criopreservación, sin embargo,
23 los estudios sistemáticos son pocos ya que el bajo número de espermatozoides obtenidos en
24 cada eyaculado así como la dificultad para trabajar con gran número de animales limita la

1 posibilidad de realizar varios tratamientos en un mismo experimento (Chatdarong y col.,
2 2010). Si bien existen algunas comunicaciones sobre la recuperación y criopreservación de
3 EE en felinos (Hay y Goodrowe, 1993; Pushett y col., 2000; Axner y col., 2004; Luvoni,
4 2006; Tebet y col., 2006). Existen pocos estudios de la influencia de diferentes crioprotectores
5 incorporados al diluyente de congelación sobre la supervivencia espermática tanto seminal
6 como epididimal al descongelado. Basándose en estudios realizados en caninos, Chatdarong
7 ha desarrollado un protocolo para la preservación de EF (Chatdarong y col., 2007).

8 Se sabe que los procesos de criopreservación provocan alteraciones de las membranas
9 y del metabolismo celular así como pérdida de la motilidad espermática, provocando
10 disminución de la fertilidad al descongelado (Hammerstedt y col., 1990; Watson, 1995). La
11 función de las membranas espermáticas está determinada por la interacción de los diversos
12 componentes, y cualquier evento ocurrido durante el proceso de criopreservación capaz de
13 alterar esta interacción puede esperarse que altere su función (Aloia, 1988).

14 Durante el proceso de congelación se pierde aproximadamente el 50% de la población
15 inicial de espermatozoides debido a los efectos del proceso sobre las membranas,
16 citoesqueleto, aparato motor y núcleo del espermatozoide (Watson, 1995; Mazur y col., 1970;
17 Parks y Lynch, 1992). Los cambios más evidentes son la pérdida de la motilidad espermática
18 y la pérdida de la integridad acrosómica (Paulens, 1993). Obtener un alto porcentaje de
19 espermatozoides fértiles luego del proceso de congelación-descongelación traerá como
20 resultado un mayor porcentaje de preñez y camadas más numerosas. Este hecho se encuentra
21 íntimamente relacionado con la conservación de la integridad estructural y fisiológica del
22 espermatozoide al descongelado (Held, 1997). Para poder interactuar con el ovocito, el
23 espermatozoide debe estar vivo, mótil y poseer la membrana plasmática y acrosomal intactas
24 y funcionales (Stornelli MC y col., 2005). Los cambios ocurridos en las membranas del

1 espermatozoide durante la congelación-descongelación son similares a los producidos durante
2 el proceso de capacitación y reducen la longevidad espermática (Paulens, 1993). Las
3 modificaciones térmicas que se producen durante los procesos de congelación-
4 descongelación, provocan alteraciones físicas y químicas en las membranas de los
5 espermatozoides (Watson, 1995). El enfriado aumenta la longevidad del espermatozoide por
6 disminución del metabolismo, pero puede resultar en estrés y daño celular, evento conocido
7 como “shock de frío” (Watson, 1981). El shock de frío causa un cambio de fase de los lípidos
8 de la membrana, los cambios de fase ocurren en su mayoría entre los 5°C y los 15°C (Drobnis
9 y col., 1993). El enfriado aumenta el ingreso de Ca^{++} intracelular, hecho que se asocia a la
10 capacitación espermática (Yanagimachi, 1994). El enfriamiento rápido del semen entre 30°C
11 y 0°C induce un estrés letal en algunas células el cual es proporcional a la tasa de
12 enfriamiento (Stornelli MC y col., 2005). Axner y col., observaron que el proceso de
13 refrigeración no alteraba significativamente la integridad acrosómica y la integridad de
14 membrana (Axner y col., 2004). Sin embargo, se ha demostrado que la velocidad de
15 refrigeración influye en la supervivencia espermática y difiere entre los autores (Pukazhenth
16 y col., 1999; Pope y col., 1991; Zambelli, 1994; Siemieniuch y Dubiel, 2007; Axner y col.,
17 2004; Wood y col., 1993). El shock de frío es más severo cuando la membrana contiene bajas
18 concentraciones de colesterol y altas concentraciones de ácidos grasos poli-insaturados
19 (Darin-Bennet y White, 1977; White y Darin-Bennet, 1976). Ha sido demostrado en
20 diferentes especies que los EE son más resistentes al shock de frío que los espermatozoides
21 eyaculados (White, 1993; Gilmore y col., 1998). Sin embargo, EE y espermatozoides
22 eyaculados (EY) de un mismo felino no mostraron diferencias morfológicas, por lo cual la
23 exposición al plasma seminal podría ser la causa de una mayor sensibilidad de los EY al frío
24 (Axner y col., 1998). En contraposición otro estudio demostró que el origen del

1 espermatozoide no afecta la susceptibilidad al shock de frío o al efecto de la yema de huevo
2 sobre el mismo (Hermanson y Axner, 2007). Estas variaciones pueden deberse a que la
3 susceptibilidad al shock de frío se relaciona con la composición de la membrana plasmática y
4 no difiere solo entre especies sino también entre individuos (White, 1993). Si bien los EE o
5 EY felinos pueden ser exitosamente enfriados y criopreservados manteniendo la capacidad
6 fecundante, la sensibilidad al frío ha sido poco estudiada (Platz y col., 1978; Tsutsui y col.,
7 2003; Chatdarong y col., 2006; Harris y col., 2001). Diferentes estudios muestran que el
8 origen espermático (epididimal, del conducto deferente o del eyaculado) no afecta la
9 supervivencia al descongelado en el felino (Hay y Goodrowe, 1993; Tebet y col., 2006). En
10 concordancia con lo anteriormente mencionado, Tebet y col., obtuvieron resultados exitosos
11 usando EE para IA (Tebet y col., 2006). Sin embargo, los estudios realizados en este área son
12 escasos y de limitado desarrollo en comparación con la evolución de la criopreservación de
13 semen e IA en otras especies domésticas.

14 Otros factores que modifican la integridad de las membranas (IM) de los
15 espermatozoides son los relacionados con las características físico-químicas de los diluyentes
16 utilizados, los cuales pueden provocar alteraciones ultraestructurales, bioquímicas y
17 funcionales en la célula espermática (Stornelli MC y col., 2005). Por lo tanto, entre los
18 factores que pueden producir daño sobre los espermatozoides durante los procesos de
19 criopreservación, se encuentran además del estrés térmico, aquellos relacionados con los
20 efectos tóxicos provocados por los diferentes crioprotectores y la formación de hielo en el
21 medio extra e intra celular (Gao y col., 1993; Gao y col., 1995; Watson, 1976; Watson, 1981;
22 Watson y Duncan, 1988).

23 El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en
24 la presión osmótica de la fracción no congelada (Watson, 1995). Los solutos permanecen

1 disueltos en la fracción de agua líquida aumentando la presión osmótica de la solución. El
2 proceso ideal sería aquel que logre un enfriamiento rápido que permita minimizar este efecto,
3 pero a su vez lo suficientemente lento como para permitir la salida de agua intracelular y
4 prevenir la formación de cristales de hielo dentro de la célula lo cual tiene un efecto deletéreo
5 sobre la misma (Savignone y col., 2007a).

6 En la última década se han estudiado diferentes diluyentes para la criopreservación de
7 semen felino. Los más utilizados son los que contienen Tris Base (TRIS), con el agregado de
8 distintas sustancias como por ejemplo: crioprotectores (glicerol [GLY], disacáridos),
9 macromoléculas protectoras de membranas (lipoproteínas de yema de huevo, proteínas de la
10 leche, glicoproteínas), detergentes del grupo alquil-iónico que actúan sobre la yema de huevo
11 (dodecil sulfato de sodio [SDS]) y azúcares energéticos permeables (glucosa), capaces de
12 atravesar la membrana plasmática (Axner y col., 2004; Siemieniuch y Dubiel, 2007;
13 Hermansson y Axner, 2007; Chatdarong y col., 2010).

14 Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas
15 temperaturas y en consecuencia una menor cantidad de electrolitos posibilitando la
16 supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, estos compuestos
17 producen un estrés sobre la membrana plasmática del espermatozoide (Savignone y col.,
18 2007a; Gao y col., 1993). Los crioprotectores utilizados como constituyentes de diferentes
19 diluyentes para la criopreservación de semen pueden ser clasificados como permeables o
20 intracelulares, constituidos por moléculas pequeñas que requieren una mayor concentración, y
21 no permeables o extracelulares formados por moléculas de mayor tamaño que requieren una
22 menor concentración para proteger a las células de las crioinjurias (Meryman, 1971).
23 Distintos tipos de azúcares permeables han sido utilizados para actuar como sustratos
24 energéticos para las células espermáticas y mantener la presión osmótica del diluyente como

1 glucosa y fructosa (Watson, 1979). Por otro lado, los azúcares no permeables (trealosa
2 [TREA], lactosa, sacarosa, rafinosa) brindan un medio hipertónico causando deshidratación
3 celular antes de la congelación (Crowe y col., 1989; Crowe y col., 2001). Este efecto
4 osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cuantía de daño
5 celular relacionada con la formación intracelular de cristales de hielo (Aisen y col., 2002). La
6 TREA es un disacárido que posee además una acción protectora relacionada con su
7 interacción específica con los fosfolípidos de membrana durante la desecación y congelación,
8 que puede ser capaz de prevenir la separación de fase y la fusión entre las bicapas durante la
9 congelación (Crowe y col., 1989; Crowe y col., 2001; Bakas y Disalvo, 1991; Chen y col.,
10 2000). Por lo tanto, la TREA es capaz de limitar la transición de fase y aumentar la estabilidad
11 de la membrana (Crowe y col., 1989; Chen y col., 2000). Este disacárido ha sido utilizado con
12 éxito en el semen ovino (Aisen y col., 2000, Molinia y col., 1994). Se han logrado buenos
13 resultados en ovinos con el agregado de 7,6% de TREA al diluyente base, obteniéndose un
14 64% de motilidad progresiva al descongelado, superando al porcentaje (54,3%) obtenido
15 utilizando el mismo diluyente base sin el agregado del azúcar (Crowe y col., 1989). En los
16 ovinos se ha visto que la interacción entre los lípidos de la membrana espermática y los
17 lípidos de la yema de huevo y de otros componentes de los diluyentes es inestable, y el
18 agregado de TREA y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a un diluyente Tris base en la
19 congelación de semen ha demostrado tener un efecto positivo (Aisen y col., 2000). Chen y
20 col., observaron que la TREA mejoró la supervivencia al descongelado de espermatozoides
21 bovinos que fueron congelados luego de ser almacenados a 25°C por 24 horas (Chen y col.,
22 1993). Se ha comunicado también que la TREA aumenta la proporción de espermatozoides
23 intactos en el ratón luego de la criopreservación (Storey y col., 1998).

1 En caninos la TREA junto con otros disacáridos como la lactosa, manosa y sacarosa
2 fueron capaces de reducir los daños acrosomales durante la equilibración. A su vez se vio que
3 los disacáridos redujeron la muerte al descongelado y/o el porcentaje de daño acrosomal pero
4 sin mejorar la motilidad (Yildiz y col., 2000). Stornelli y col., evaluaron el efecto
5 crioprotector de la TREA sobre el semen canino pero no encontraron efectos benéficos al
6 incluir este disacárido al diluyente para criopreservar el semen, obteniendo índices de
7 congelabilidad (IC) inferiores con el agregado 5% y 7% de TREA en comparación con el
8 diluyente TRIS sin el agregado de este azúcar. Sin embargo, con el agregado de 5% de TREA
9 obtuvieron IC superiores a los obtenidos con 7% y 9% de TREA lo cual se correlacionaría
10 con la concentración del azúcar en el diluyente y la hipertonía del medio (Stornelli MA,
11 2004). Esto podría explicarse por la sensibilidad del espermatozoide canino al estrés
12 osmótico. La utilización de menores cantidades de TREA adicionadas al diluyente
13 manteniendo la osmolalidad del diluyente TRIS permitió que este azúcar estabilizara las
14 membranas espermáticas de los espermatozoides caninos evitando el estrés osmótico causado
15 por concentraciones mayores (Savignone y col., 2008). Es así que el agregado de TREA al
16 diluyente utilizado para congelación de semen felino en cantidades que no modifiquen la
17 osmolalidad del diluyente TRIS podría lograr una mejor supervivencia espermática post
18 descongelación.

19 Por otro lado, los crioprotectores permeables (GLY, propilenglicol, etilenglicol)
20 permiten remover gran parte del agua intracelular antes del proceso de congelación, evitando
21 la formación de cristales de hielo y previniendo de esta manera la ruptura celular asociada a
22 este proceso. El etilenglicol ha sido usado eficazmente en la criopreservación de embriones
23 bovinos por su mayor permeabilidad (Voelkel y Hu, 1992). Sin embargo, si lo comparamos
24 con el GLY, el etilenglicol posee efectos tóxicos de mayor cuantía sobre la célula

1 espermática. El GLY es el crioprotector más frecuentemente utilizado en la congelación de
2 semen, y una de sus principales funciones es la de disminuir la temperatura de congelación de
3 la solución. Es una sustancia permeable que reduce los daños celulares durante el proceso de
4 criopreservación, aunque es tóxico para los espermatozoides y a altas concentraciones puede
5 alterar la viabilidad espermática interfiriendo con la capacidad fecundante del semen
6 criopreservado (Concannon y col., 1989). Nelson y col., comunicaron efectos deletéreos con
7 el uso en exceso de Dimetil Sulfóxido (DMSO) y GLY al congelar semen felino (Nelson y
8 col., 1999). La toxicidad del GLY parece estar relacionada a efectos osmóticos debido a un
9 aumento en el volumen celular, y efectos no osmóticos relacionados con la toxicidad del GLY
10 sobre el citoesqueleto, lo que disminuye la capacidad de adaptación del espermatozoide frente
11 al estrés osmótico (Macías García y col., 2012). Los efectos tóxicos producidos por el GLY se
12 relacionan con la alteración de la bicapa lipídica, la interacción con las proteínas de
13 membrana y glicoproteínas y la inducción del aumento de la demanda bioenergética
14 (Anchordoguy y col., 1987; Armitage, 1986; Crowe y col., 1987; Gomes y col., 2002;
15 Hammerstedt y col., 1990; Hempling y White, 1984). Este hecho puede ser considerado como
16 uno de los factores responsables de los fracasos ocurridos en ciertas ocasiones con el uso de
17 este crioprotector en la criopreservación de semen (Gomes y col., 2002). Gao y col., han
18 demostrado que este estrés puede reducirse mediante la incorporación del GLY en etapas
19 (Gao y col., 1993). En la congelación de semen de bovinos, así como en rumiantes silvestres,
20 al usar concentraciones que oscilan entre 4 y 8% de GLY se observaron buenos resultados.
21 Sin embargo, concentraciones tan altas como 8% de GLY no son toleradas en otras especies
22 (Holt, 2000). Axner y Linde-Fosberg proponen utilizar una concentración de 5% de GLY para
23 congelar semen felino (Axner y Linde-Fosberg, 2002). De acuerdo con esto, Villaverde y col.,

1 exponen que 5% de GLY es una concentración óptima para criopreservar semen en el felino
2 doméstico (Villaverde y col., 2013).

3 La toxicidad del GLY varía y se ve influida por la especie; por lo que la concentración
4 final óptima resulta de un equilibrio entre el efecto protector y el efecto tóxico del
5 crioprotector (Nelson y col., 1999). No obstante, sería conveniente continuar los estudios para
6 determinar cuál es el nivel óptimo de GLY para congelar semen en el felino doméstico.

7 Trabajos recientes muestran que la adición de amidas al diluyente en diferentes
8 concentraciones en reemplazo de parte del GLY, permite mejorar los parámetros de
9 contrastación seminal *in vitro*, al presentar este compuesto menores efectos tóxicos sobre la
10 célula espermática. Las amidas pertenecen al grupo de crioprotectores permeables, que actúan
11 por medio de sus propiedades coligativas disminuyendo el punto de congelación del agua
12 intracelular y reduciendo la formación de cristales de hielo en el interior de la célula (Bianchi y
13 col., 2008). De este modo más agua queda en estado líquido a bajas temperaturas manteniendo
14 así una baja concentración intracelular de solutos creando así un ambiente menos dañino para
15 el espermatozoide durante la congelación (Holt, 2000). Este efecto benéfico ha sido
16 comprobado en equinos y aves, no así en caninos especie en la cual se observaron efectos
17 negativos sobre la MI, IM e AI; estas diferencias pueden atribuirse a la distinta composición
18 de las membranas en las distintas especies (Gomez y col., 2002; Savignone y col., 2007b). En
19 felinos aún no hay trabajos que estudien la acción de las amidas sobre la supervivencia
20 espermática al descongelado. La Dimetilformamida (DMF) es una amida con menor peso
21 molecular que el GLY; por lo tanto puede reducir el estrés osmótico. La incorporación al
22 diluyente TRIS de DMF permitiría reducir la cantidad de GLY adicionada al diluyente y
23 minimizar los efectos tóxicos del mismo sobre los EF durante el proceso de congelación-
24 descongelación.

1 Debido a que durante la criopreservación se desestabilizan las membranas, surge la
2 necesidad de utilizar algún mecanismo estabilizante que modifique la fluidez y proteja al
3 espermatozoide durante el proceso (Watson, 1995). Los detergentes son sustancias capaces de
4 solubilizar y alterar las membranas celulares y sus componentes. Los del grupo alquil-iónico,
5 al cual pertenece el SDS desnaturalizan la estructura nativa de las proteínas de membrana y
6 las disocian en sus cadenas polipeptídicas. Sin embargo, se ha observado que este detergente,
7 si se agrega al diluyente en pequeñas cantidades, posee un efecto benéfico sobre la motilidad
8 espermática e integridad acrosómica durante los procesos de congelación-descongelación,
9 gracias a su acción sobre la fracción lipoproteica de baja densidad de la yema de huevo la cual
10 ejerce su acción protectora sobre la superficie celular (Watson, 1976; Pursel y col., 1978). Se
11 ha comprobado la acción del SDS mejorando el efecto crioprotector de los diluyentes de
12 semen en algunas especies (Arriola y Foote, 1987; Peña y Linde-Forsberg, 2000; Axner y
13 col., 2004). Diluyentes a los que se les ha adicionado diferentes cantidades de Equex STM
14 paste u OEP, ambos contienen SDS, al diluyente ha sido benéfico en porcinos, bovinos,
15 equinos, caninos, felinos y ratón mejorando la motilidad e integridad acrosómica; con alta
16 fertilidad *in vivo* e *in vitro* (Arriola y Foote, 1987; Martin y col., 1979; Rota y col., 1997; Rota
17 y col., 1999; Peña y Linde-Forsberg, 2000; Peña y col., 2003; Stornelli MA, 2004; Penfold y
18 Moore, 1993; Pursel y col., 1978; Axner y col., 2004). Sin embargo la adición de altos
19 porcentajes de estas sustancias afecta la estabilidad de las membranas plasmática y acrosomal
20 (Stornelli MA, 2004). En porcinos el agregado de 1-1,5% de OEP mostró un efecto benéfico
21 sobre espermatozoides criopreservados (Pursel y col., 1978). En caninos incorporar Equex
22 STM paste aumentó la termoresistencia, lo cual se ve al incorporar el detergente previo al
23 congelado y no durante el equilibrado (Peña y Linde-Forsberg, 2000). Así mismo, en caninos
24 el agregado de Equex STM Paste en concentraciones de 2%-2,5%, permitió detectar mediante

1 el uso de microscopia electrónica una mayor cantidad de alteraciones ultraestructurales en el
2 espermatozoide que cuando se agrego 1-1,5% de SDS al diluyente (Jurado y col., 2005;
3 Stornelli MA, 2004; Stornelli MC y col., 2005; Stornelli MA y de la Sota, 2006). En felinos el
4 Orvus, el Equex STM paste y el SDS han sido usados con buenos resultados (Axner y col.,
5 2004; Chatdarong y col., 2007; Mizutani y col., 2010). Axner y col., observaron que la
6 adición de Equex STM Paste al diluyente mejora en el felino doméstico el porcentaje de
7 acrosomas intactos en EE criopreservados, pero tiene un efecto negativo sobre la longevidad
8 durante la incubación a 38°C (Axner y col., 2004). Se podría señalar, que altas
9 concentraciones de SDS no mejoraría la protección ya que una vez que el detergente actúa
10 sobre la totalidad de los lípidos de la yema de huevo presente en el diluyente lo que hará será
11 aumentar los daños ultraestructurales de los espermatozoides. Por lo tanto, el efecto benéfico
12 del detergente se observará hasta que la cantidad adicionada sea tal que comience a actuar
13 sobre las membranas de la célula espermática (Pursel y col., 1978). Las concentraciones
14 óptimas de detergente u OEP varían según las especies (Hori y col., 2006). El agregado de
15 cantidades adecuadas de SDS al diluyente TRIS durante la congelación de EF permitiría
16 obtener altos IC manteniendo las membranas de la célula espermática más estables.

17 La formulación de un diluyente Tris base que posea en su composición el agregado de
18 más de un crioprotector potenciando sus acciones protectoras mejoraría la viabilidad y los
19 parámetros espermáticos evaluados al descongelado.

20 Durante la descongelación el espermatozoide atraviesa por todos los procesos que le
21 ocurrieron durante el enfriado y congelado, pero a la inversa. Las células pueden sufrir daños
22 irreversibles debido al estrés osmótico por el incremento del volumen celular y salida del
23 crioprotector de su interior (Gao y col., 1995; Gao y col., 1997). Los diferentes tipos de estrés
24 a los cuales están sometidos los espermatozoides, durante los procesos de enfriamiento,

1 congelación y descongelación, pueden producir alteraciones celulares observables sobre la
2 ultraestructura del espermatozoide. Los procesos de congelación y descongelación podrían
3 reducir la longevidad de la célula espermática por alteración de la estructura de la membrana
4 plasmática, lo cual explicaría por qué la tasa de concepción obtenida con la inseminación IU
5 es mejor que la obtenida por inseminación IV al usar semen congelado-descongelado (Ström
6 y col., 1998; Burgess y col., 2001).

7 En el humano la subfertilidad o infertilidad se ha visto asociada a baja concentración
8 espermática (oligospermia), pobre motilidad espermática (astenozoospermia) o anormalidades
9 morfológicas (teratozoospermia). El estudio de alteraciones espermáticas en los casos de
10 infertilidad humana han sido demostrados por microscopia electrónica, observándose
11 malformaciones acrosomales, anormalidades en el axonema y defectos de cromatina como
12 algunas de las anormalidades más frecuentes; que pueden ocurrir a consecuencia de distintas
13 patologías (hipogonadismo, varicocele, infecciones, infertilidad inmunológica, obstrucciones
14 y criptorquidismo, Isidori y col., 2005).

15 El felino doméstico ha sido clasificado como teratospérmico en relación al alto
16 porcentaje de anormalidades espermáticas presentes en el semen de felinos sanos y fértiles
17 (Axner y Linde-Forsberg, 2007; Long y col., 1996). La calidad del eyaculado difiere dentro
18 de la especie felina, algunos felinos silvestres poseen baja variabilidad genética por lo que
19 tienen alta incidencia de teratospermia y un alto número de espermatozoides con defectos
20 acrosomales, como el chita (*Acinonyx jubatus*; Wildt y col., 1992). El estudio morfológico de
21 la célula espermática es uno de los indicadores de funcionalidad celular muy importante al
22 momento de determinar la calidad de una muestra (Claassens y col., 1992). En algunas
23 especies como en los bovinos el impacto de las morfoanomalías sobre la fertilidad se
24 encuentra bien definido, sin embargo no ha sido tan estudiado en los felinos. Es probable que

1 así como ocurre en otras especies, las alteraciones de la morfología espermática afecte la
2 capacidad fecundante de la célula. Howard y col. han demostrado que felinos con menos del
3 40% de espermatozoides morfológicamente normales tienen bajas tasas de penetración en la
4 zona pelúcida comparado con felinos con 60% o más de espermatozoides normales (Howard
5 y col., 1993).

6 Las anormalidades se clasifican según su origen en primarias aquellas que se originan
7 en el testículo durante la espermatogénesis, y secundarias a las adquiridas en el epidídimo
8 durante la maduración y transporte de los mismos a través de él (Platz y col., 1976). Las
9 anormalidades primarias suelen comprometer más la fertilidad que las secundarias (Wildt y
10 col., 1987; Howard y col., 1990; Howard y col., 1991). La influencia de la estación del año
11 sobre la producción espermática ha sido bien definida en los últimos años (Axner y Linde-
12 Forsberg, 2007; Stornelli MA y col., 2009; Nuñez Favre y col., 2012) Es así que el porcentaje
13 y tipo de morfoanomalía variará según el felino se encuentre o no en la estación reproductiva
14 (Nuñez Favre y col., 2012). Así como la estación del año, la edad del ANI es otro factor
15 relacionado con la ocurrencia de anomalías espermáticas (Axner y Linde-Forsberg, 2007).
16 Algunas anormalidades espermáticas disminuyen durante el tránsito en el epidídimo, mientras
17 que otras se originan en el mismo, principalmente las localizadas en la cola espermática
18 (Axner y col., 1999).

19 Aunque la morfología espermática puede evaluarse con un microscopio de contraste
20 de fase en las especies de producción, el principal método para diferenciar entre células
21 normales y anormales en caninos y felinos es el uso de extendidos de semen teñido con
22 coloraciones especiales (Stornelli MA, 2007a b; Nuñez Favre y col., 2011). El estudio
23 morfológico permite detectar anormalidades de la cabeza, de la pieza intermedia y de la cola,
24 defectos acrosomales específicos o variaciones del tamaño de las cabezas. Células

1 espermáticas que son consideradas normales al microscopio óptico (MO) pueden presentar
2 alteraciones en su morfología que sólo son detectables al microscopio electrónico (ME). La
3 evaluación morfológica usando microscopía electrónica de transmisión o de barrido es muy
4 valiosa porque provee información detallada acerca de la morfología e integridad de la célula
5 espermática que no es posible obtener por medio de otras metodologías. Esta información
6 posibilita estimar la fertilidad del semen analizado con mayor exactitud que otras pruebas de
7 análisis de semen *in vitro* (Jurado y col., 2008). Los detalles ultraestructurales de cualquier
8 alteración morfológica del semen o el grado de daño de membrana son mejor evaluados
9 usando este tipo de microscopios de alta resolución (Oettle y Soley, 1988; Rodríguez-
10 Martinez y col., 1993). El microscopio electrónico de barrido (MEB) permite examinar el
11 espermatozoide completo a un nivel de magnificación elevado y con mayor poder de
12 resolución que el MO. Además, el secado por punto crítico empleado en este tipo de
13 microscopía evita las deformaciones de las células espermáticas apreciándose mejor las
14 estructuras superficiales (Liakatas y col., 1982, Sterzik y col., 1998). Por otro lado, el
15 microscopio electrónico de transmisión (MET) es una herramienta que permite realizar la
16 evaluación de las estructuras intracelulares e identificar numerosos defectos estructurales,
17 tanto de la cabeza como de la cola, que interfieren en el proceso de la fecundación. Si bien la
18 morfología espermática y la motilidad, estudiadas al MO, son pruebas de contrastación usadas
19 en la evaluación seminal, no son eficientes para detectar alteraciones cuando los defectos
20 morfológicos poseen magnitud a escala ultramicroscópica (Crespilho y col., 2006). Por otra
21 parte, el daño subcelular puede afectar la fertilidad sin tener necesariamente un impacto en la
22 motilidad (Blottner y col., 2001). Los procesos de congelación-descongelación producen
23 alteraciones importantes en la membrana plasmática y acrosómica así como en la distribución
24 del contenido acrosomal. Se han comunicado distintos daños mediante ME en el semen

1 congelado-descongelado en caninos como: alteración acrosómica, distribución irregular del
2 contenido acrosómico e hinchamiento, vesiculación de la membrana acrosomal externa,
3 hinchamiento y pérdida de la homogeneidad y densidad del contenido acrosómico (Jurado y
4 col., 2008). Existen escasos estudios sobre la ultraestructura de los EF (Long y col., 1996).

5 La microscopia electrónica de transmisión permitirá observar la localización de los
6 daños espermáticos y relacionarlos con los parámetros de contrastación seminal evaluados al
7 pre-congelado. Es así que el estudio ultramicroscópico resultaría de gran valor para evaluar el
8 comportamiento de un diluyente en los diferentes compartimentos celulares y estimar la
9 eficacia o no del mismo durante la congelación, pudiendo observar la localización del impacto
10 protector (Jurado y col., 2008; Savignone y col., 2008). Sin embargo, sólo una prueba de
11 fertilidad a campo permitiría evaluar la capacidad fecundante de esos espermatozoides.

12 El continuo estudio de los factores que posibilitan una mejor criopreservación
13 espermática relacionados con los procesos de congelado-descongelado y la aplicación de
14 metodologías para la congelación de EF que permitan obtener altos porcentajes de células
15 viables al descongelado posibilitarán en el futuro la aplicación frecuente de esta biotecnología.

16 En relación a lo anteriormente expuesto, los cinco objetivos de esta tesis fueron:

- 17 1. Evaluar el efecto de la adición de TREA sin variar la osmolalidad del diluyente TRIS
18 sobre la supervivencia espermática al descongelado.
- 19 2. Evaluar el efecto de la adición de DMF al diluyente TRIS sobre la supervivencia
20 espermática al descongelado.
- 21 3. Evaluar el efecto de la adición de SDS al diluyente TRIS sobre la supervivencia
22 espermática al descongelado.
- 23 4. Evaluar el efecto de la adición de TREA+SDS al diluyente TRIS sobre la
24 supervivencia espermática al descongelado.

- 1 5. Estudiar las alteraciones ultramicroscópicas observadas en los espermatozoides felinos
- 2 congelados-descongelados.
- 3

CAPITULO II

EFEECTO DE LA ADICIÓN DE TREALOSA SIN VARIAR LA OSMOLALIDAD DE UN DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA POST DESCONGELACIÓN EN FELINOS

INTRODUCCIÓN

En la última década se han estudiado diferentes diluyentes para la criopreservación de espermatozoides. Sin embargo los resultados de diversos estudios muestran que el protocolo y la composición de los diluyentes podrían mejorarse para obtener mayor eficiencia reproductiva con el uso de semen criopreservado. Este hecho cobra especial importancia en felinos, especie en la cual los estudios en este tópico son escasos. La Trealosa (TREA) es un disacárido que pertenece al grupo de los crioprotectores no penetrantes o extracelulares que brindan un medio hipertónico causando deshidratación celular antes de la congelación (Crowe y col., 1989; Crowe y col., 2001). La TREA posee además una acción protectora relacionada con la interacción específica del disacárido con los fosfolípidos de membrana durante la desecación y congelación. Mediante este mecanismo es capaz de prevenir la separación de fase y la fusión entre las bicapas durante la congelación (Crowe y col., 1989; Crowe y col., 2001; Bakas, 1991; Chen y col., 2000; Anchoroguy, y col., 1987; Aisen y col., 2002; Crowe y col., 1984). Este disacárido forma uniones con los fosfolípidos que hacen a la membrana menos vulnerable a los cambios morfológicos que ocurren durante el rápido movimiento de agua (Rudolph y Crowe, 1985; De Leeuw y col., 1993; Aisen y col., 2002; Aboagla y Terada, 2003). La TREA interviene en la fluidez de la membrana haciéndola más estable durante el proceso de congelación (Aboagla y Terada, 2003). Se ha comunicado además que la TREA

1 reduce los efectos deletéreos producidos por el estrés oxidativo (Hu y col., 2009). Las
2 propiedades anteriormente detalladas, harían a la TREA un crioprotector más efectivo que
3 otros disacáridos (Anchordoguy y col., 1987).

4 Existen numerosos trabajos que estudiaron el efecto de la adición de TREA al
5 diluyente de congelación (Chen y col., 1993; Sztein y col., 2001; Wolders y col, 1997; Yildiz
6 y col, 2000; Aisen y col., 2002; Aboagla y Terada, 2003; Reddy y col., 2010). Varios de estos
7 estudios revelaron un efecto favorable del disacárido en la calidad del semen al descongelado
8 (Dalimata y Graham, 1997; Liu y col., 1998; Yildiz y col., 2000; Aisen y col., 2000; Aisen y
9 col., 2002; Aboagla y Terada, 2003; Yamashiro y col., 2007; Hu y col., 2009; Hu y col., 2010;
10 Sztein y col., 2001). Es así que la TREA ha sido utilizada con éxito para congelar semen
11 ovino (Aisen y col., 2000; Molinia y col., 1994). En la mencionada especie se lograron
12 buenos resultados con el agregado de 100mOsm/L de TREA al diluyente base en
13 comparación con el diluyente sin TREA (Aisen y col. 2002). Concordando con lo observado
14 por Aisen y col., otros investigadores observaron que la adición de TREA a un diluyente
15 aumentó la supervivencia de semen congelado en el ovino (Matzuoca y col., 2006; Berlinguer
16 y col., 2007; Bucak y col., 2007; Tonieto y col., 2010; Jafaroghli y col., 2011, Quan y col.,
17 2012). Aisen y col., observaron en el test hiposmótico que el porcentaje de membranas
18 íntegras era significativamente más alto en el diluyente que contenía TREA comparado con
19 aquel diluyente que no la contenía (Aisen y col., 2005). Así mismo, pudieron detectar una
20 reducción en el estrés oxidativo sufrido por las células criopreservadas (Aisen y col., 2005).
21 La TREA logró mejorar la viabilidad y fertilidad del semen congelado-descongelado en
22 ovinos, permitiendo la obtención de una tasa de fertilidad 2,5 veces mayor que la tasa
23 obtenida con el diluyente sin trealosa (Aisen y col., 2000; Aisen y col., 2002; Aisen y col.,
24 2005). Siguiendo con estos hallazgos, Aisen y col., observaron en ovinos un efecto favorable

1 en la motilidad espermática luego de descongelar semen criopreservado con bajas
2 concentraciones de TREA agregadas al diluyente y un efecto desfavorable al congelar con
3 altas concentraciones (Aisen y col., 2002).

4 En porcinos se observó un efecto protector con el agregado de TREA al diluyente de
5 congelación (Hu y col., 2009). Hu y col. evaluaron el efecto de distintas cantidades de TREA
6 en los parámetros espermáticos pos descongelación, obteniendo los mejores resultados al
7 utilizar 100 mOsm/L de TREA (Hu y col., 2009). De acuerdo con lo descripto por Aisen y
8 col. en ovinos, en porcinos se observó un efecto deletéreo sobre la motilidad, actividad
9 mitocondrial e integridad de membrana de espermatozoides criopreservados con
10 concentraciones más altas (200 mOsm/L) del disacárido (Hu y col., 2009; Aisen y col., 2002).

11 A diferencia de lo observado en otras especies, como porcinos y ovinos, Aboagla y
12 Terada comunicaron que la TREA adicionada al diluyente en altas concentraciones (260-375
13 mOsm/L) mejora significativamente la congelabilidad del semen caprino (Aboagla y Terada,
14 2003). Los mencionados autores observaron un aumento en la fluidez de la membrana
15 espermática antes del congelado y una disminución en las anormalidades espermáticas al
16 descongelado cuando se comparó la TREA con sacarosa (Aboagla y Terada, 2003; Jafaroghli
17 y col., 2011).

18 En bovinos, distintos investigadores observaron un efecto benéfico con el agregado de
19 100 mOsm/L de TREA a un diluyente de congelación sobre la calidad espermática evaluada
20 al descongelado (Hu y col., 2010; Chhillar y col., 2012). En esta especie, los trabajos
21 realizados revelaron una mejor motilidad y viabilidad espermática, así como también un
22 efecto positivo en la reducción de los daños asociados al estrés oxidativo y en la prevención
23 de la capacitación espermática (Hu y col., 2010; Chhillar y col., 2012). Similares resultados se
24 obtuvieron en bubalinos (Reddy y col., 2010). Por el contrario, en el conejo (*European*

1 *brown*) no se observó una mejora en la viabilidad ni un aumento en la fertilidad del semen
2 criopreservado con TREA (Kozdrowski, 2009). En esta especie con el uso de la misma
3 concentración de TREA (100 mOsm/L) que mejora la calidad de semen al descongelado en
4 especies como porcinos, bovinos y bubalinos, se observó una disminución en la motilidad
5 espermática (Kozdrowski, 2009; Aisen y col., 2002).

6 Stornelli y col., evaluaron el efecto crioprotector de la TREA sobre el semen canino
7 pero no encontraron efectos benéficos al incluir TREA al diluyente para criopreservar semen
8 canino, obteniendo IC inferiores con el agregado de TREA en comparación con el diluyente
9 TRIS sin el agregado de este azúcar. Sin embargo con el agregado de 5% de TREA
10 obtuvieron IC superiores a los obtenidos con 7% y 9% de TREA lo cual se correlacionaría
11 con la concentración del azúcar en el diluyente y la hipertonía del medio (Stornelli MA,
12 2004). Esto podría explicarse por la sensibilidad del espermatozoide canino al estrés
13 osmótico. La utilización de menores cantidades de TREA adicionadas al diluyente, las cuales
14 no modificaban la osmolalidad del Tris base, permitió que este azúcar estabilizara las
15 membranas espermáticas de los espermatozoides caninos evitando el estrés osmótico causado
16 por concentraciones mayores (Savignone y col., 2007a).

17 Las variaciones observadas en la supervivencia espermática al descongelado,
18 obtenidas en las distintas especies en relación a la cantidad de TREA incorporada al diluyente,
19 podría deberse a la diferente composición de las membranas, a la composición de los
20 diluyentes utilizados o a diferencias en la tolerancia osmótica de cada especie y/o individuo
21 en particular.

22 Si bien se han realizado estudios sobre congelación de semen felino, no se ha
23 estudiado el efecto de la adición de TREA al diluyente de congelación espermática. El
24 agregado de TREA al diluyente utilizado para congelación de EF en cantidades que no

1 modifiquen la osmolalidad del Tris base podría lograr una mejor supervivencia espermática post
2 descongelación.

3 El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de TREA al diluyente
4 Tris base sobre la supervivencia espermática al descongelado. La hipótesis planteada fue que
5 la incorporación al diluyente Tris base de concentraciones de TREA que no modifiquen la
6 osmolalidad del Tris producirá una mayor acción protectora sobre los espermatozoides
7 durante el proceso de congelación-descongelación.

8

9

MATERIALES Y MÉTODOS

10 Con el fin de cumplir con el objetivo planteado se diseñaron dos experimentos.

11 Experimento 1

12 Se utilizaron felinos (n=15) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un
13 peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual, utilizando un diseño aleatorio (Petersen, 1985). Los
14 felinos utilizados fueron incluidos en un plan de control urbano de la reproducción. Luego de
15 la orquitectomía bilateral, los testículos y epidídimos (EPI) de cada ANI se colocaron
16 inmediatamente en solución fisiológica (SF) con el agregado de 100 IU/ml de penicilina,
17 mantenidos a temperatura ambiente y enviados rápidamente al laboratorio (Slatter, 1993).

18 Los EPI fueron procesados dentro de las 4 h posteriores a la orquitectomía, tiempo que
19 se tarda desde la orquitectomía hasta la llegada de los órganos al laboratorio. Se separaron las
20 colas de los epidídimos y se atemperaron en un baño termostatzado a 37°C por 10 minutos en
21 0,75 ml de Tris base (Tris 3,025g, ácido cítrico 1,27 g, fructosa 1,25 g, agua destilada csp 100
22 ml). La recuperación de los EE se realizó por cutting de la cola del epidídimo (Tittarelli y col.,
23 2006).

24

1 Pruebas de contrastación del material seminal *in vitro*:

2 Los EE obtenidos en Tris base fueron colocados en un baño termostatzado a 37°C y
3 sometidos a las siguientes pruebas de contrastación:

4 Examen macroscópico: 1) Color; 2) Aspecto; 3) Volumen (ml).

5 Examen microscópico: 1) Concentración espermática (CE; $10^6/\text{ml}$), se calculó realizando el
6 conteo en cámara de Neubauer (Johnston y col., 2001); 2) Motilidad individual (MI), una
7 muestra de 10 μl de los EE frescos se colocó en un portaobjetos limpio a 37°C, se le colocó
8 un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X. Se estimó, en varios campos, el
9 porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (Johnston y col., 2001); 3) Vigor (VI,
10 escala 1-5), se colocó 10 μl de los EE frescos en un portaobjetos limpio a 37°C, se le colocó
11 un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X. Se estimó, en varios campos, el tipo
12 de movimiento individual (Johnston y col., 2001; Axnér y col., 1998); 4) Morfología
13 espermática (ME; % de espermatozoides normales), se observaron 100 espermatozoides por
14 microscopía a 1000 X utilizando tinción 15 Biopur (Axnér y col., 1998); Figura 2.1A; 5)
15 Acrosomas intactos (AI, % de acrosomas intactos), una muestra de los EE se procesó para su
16 estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de *Pisum sativum* aglutinin-
17 isotiocianato de fluoresceína (Mendoza y col., 1992). Se observaron 100 acrosomas a 1000 X;
18 Figura 2.1B; 6) Integridad de membrana (IM, % membranas intactas), una muestra de los EE
19 se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de diacetato de
20 carboxifluoresceína (DIC) y Yoduro de propideo (YP; Harrison y Vickers, 1990). Se
21 observaron 100 espermatozoides 1000 X; Figura 2.1C.

22

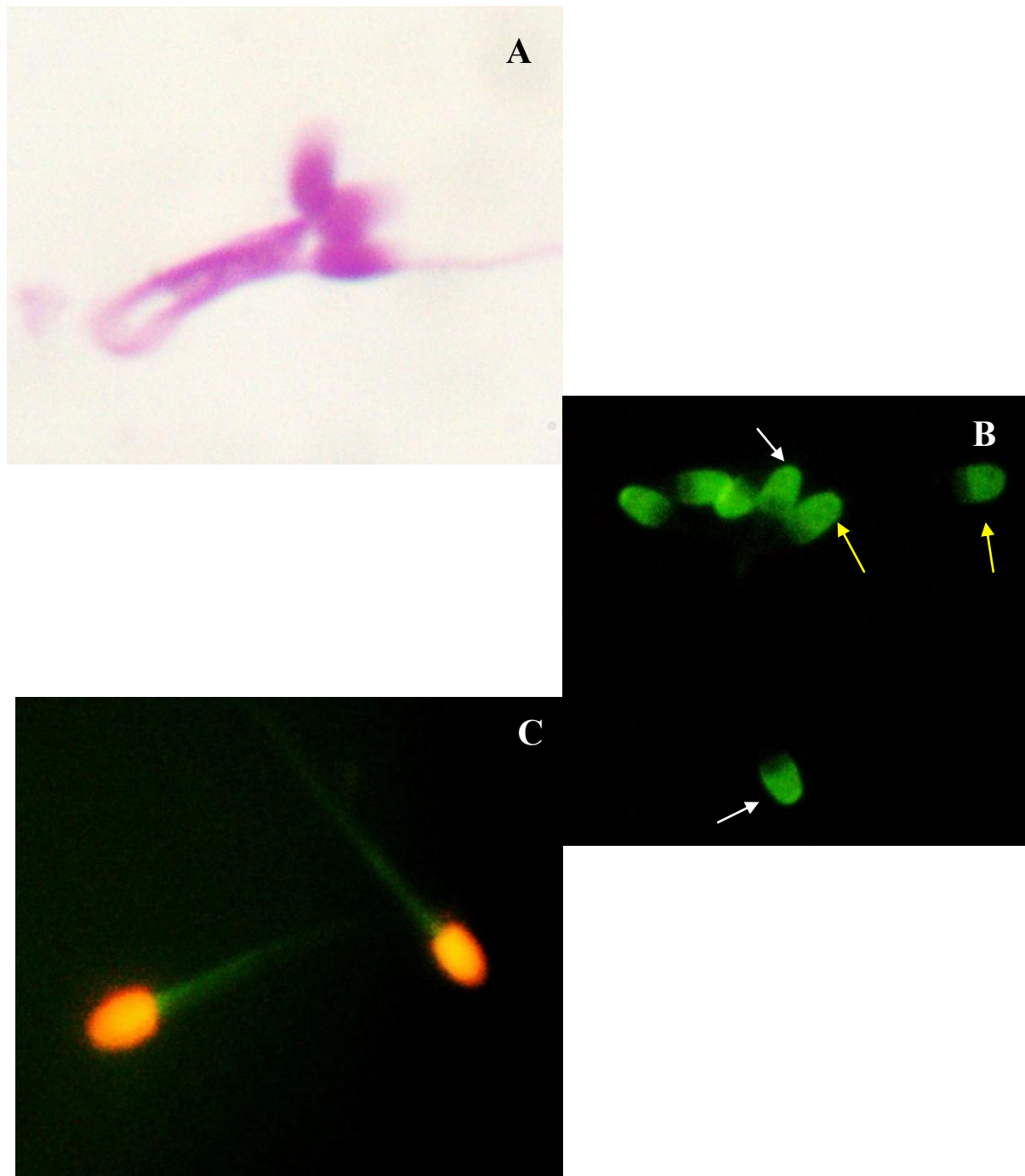


Figura 2.1. Pruebas de contrastación del material seminal *in vitro*. A: tinción 15[®] Biopur SRL, objetivo 1000X, se observa un espermatozoide felino con 3 cabezas y piezas intermedias y colas triples; B: estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de *Pisum sativum* aglutinin-isotiocianato de fluoresceína, se observan varios espermatozoides felinos con sus acrosomas intergros (flecha blanca) y acrosomas rotos (flecha amarilla). C: estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de DIC y YP, se observan dos EF con membrana plasmática rota.

1 Para realizar la congelación de los EE se utilizaron dos diluyentes diluyentes (n=2)
 2 diferentes. Los EE recuperados se mezclaron con un volumen calculado de cada uno de los
 3 diluyentes descriptos para obtener una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml. Se
 4 utilizó un diluyentes Tris base sin el agregado trealosa (TRIS) o con el agregado de 0,312%
 5 (3.3 mOsm/L) de trealosa (TREA). El diluyente TRIS que se utilizó tenía la siguiente
 6 composición: Tris (2,4 g), ácido cítrico (1,4 g), fructosa (0,6 g), glicerol (5 g), yema de huevo
 7 (20% v/v), penicilina sódica (0,06 g), sulfato de estreptomicina (0,1 g), y agua destilada
 8 (cantidad suficiente para[csp] 100ml; Zambelli y col., 2002). Luego de un tiempo de
 9 equilibración de 1 hora a 4°C, los EE diluidos fueron envasados en pajuelas de 0,25 ml y
 10 congelados de acuerdo a la técnica descripta por Axner (Axner y col., 2004). La
 11 descongelación de los EE se realizó a 37 °C durante 1 minuto (Stornelli MA, 2004).

12 Los EE congelados-descongelados fueron sometidos a las mismas pruebas de
 13 contrastación microscópica que los EE frescos.

14

15 **Experimento 2**

16 Se utilizaron felinos (n=4) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un
 17 peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual, utilizando un diseño aleatorio (Petersen, 1985). Los
 18 felinos fueron alojados en una habitación acondicionada, en jaulas individuales, alimentados
 19 con alimento balanceado (Fit 32[®], Royal Canin, Argentina) y agua *ad-libitum*. Los ANI se
 20 encontraban sometidos a un régimen de luz artificial incandescente con luces de 100 W a
 21 aproximadamente 50 cm de los felinos. Para mantener la producción espermática durante el
 22 estudio se alternaron ciclos de fotoperíodo largo (CFL) con ciclos de fotoperíodo cortos
 23 (CFC; Nuñez y col., 2012). Los felinos fueron anestesiados con ketamina (25 mg/kg i.m;
 24 Ketamina 50[®], Holliday-Scott SA, Argentina, xylazina (1mg/kg i.m; Kensol[®] Köning SA,

1 Argentina) y atropina (0.04 mg/kg i.m.; Slatter, 1993) y sometidos cada 15 días a
2 electroeyaculación (Stornelli MA y col., 2007a; Nuñez y col., 2012). La electroeyaculación
3 fue realizada mediante la técnica descrita por Howard y col. (Howard y col., 1990). Los
4 animales recibieron un total de 80 estímulos divididos en 3 series (de 30, 30 y 20 impulsos
5 respectivamente) con 2-3 minutos de descanso entre las series. La primera serie consistió en
6 10 estímulos de 2V, 10 estímulos de 3V y 10 estímulos de 4V. La segunda serie consistió en
7 10 estímulos de 3V, 10 estímulos de 4V y 10 estímulos de 5V. Por último se aplicaron 10
8 estímulos de 4V y 10 estímulos de 5V. Se obtuvieron un total de 12 eyaculados, 3 por cada
9 ANI.

10 El semen obtenido fue congelado con los diluyentes y la metodología descrita en el
11 experimento 1. Se utilizó la misma metodología de descongelación. El semen fresco y
12 congelado-descongelado fue sometido a las mismas pruebas de contrastación descritas en el
13 Experimento 1.

14

15 **Análisis estadístico**

16 Los datos fueron analizados mediante ANOVA con PROC GLM de SAS[®] (SAS,
17 2003).

18

19 **Marco bioético del uso de animales**

20 Este experimento se realizó respetando las recomendaciones internacionales
21 especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y utilizando las
22 recomendaciones de la Academia de Ciencias de EEUU referidas al uso de felinos como
23 animales de laboratorio (National Research Council, 2002). Estas recomendaciones fueron
24 tenidas en cuenta en lo referente a la atención veterinaria, medio ambiente, alimentación,

1 sanidad, identificación, sujeción, administración de drogas, toma de muestras de sangre y
2 procedimientos experimentales (National Research Council, 2002). Además contó con la
3 aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de
4 la FCV-UNLP (26-4-12).

5

6

RESULTADOS

7 En el experimento 1, el porcentaje de MI, IM e AI en los EE frescos fue superior al de
8 los EE congelados-descongelados ($60,71 \pm 3,08$ vs $18,66 \pm 3,08$; $61,78 \pm 3,08$ vs $25,17 \pm 3,08$;
9 $50,07 \pm 3,08$ vs $26,14 \pm 3,08$; $P < 0.001$; Figura. 2.2. A.C, y D). El porcentaje de MI, VI, IM y AI
10 fueron similares entre los EE congelados-descongelados con TRIS o con TREA (Figura 2.3.
11 A-D).

12 En el experimento 2, el porcentaje de MI, VI, IM y AI en el semen fresco fue superior
13 al del semen congelado-descongelado ($89,09 \pm 3,86$ vs $20,27 \pm 3,86$; $4,81 \pm 0,11$ vs $3,27 \pm 0,11$;
14 $76,72 \pm 4,31$ vs $28,22 \pm 4,31$; $63,18 \pm 4,53$ vs $51,45 \pm 4,75$; $P < 0.001$; Figura 2.4. A-D). El
15 porcentaje de MI, VI, IM y AI fue similar entre el semen congelado-descongelado con TRIS o
16 con TREA (Figura 2.5. A-D).

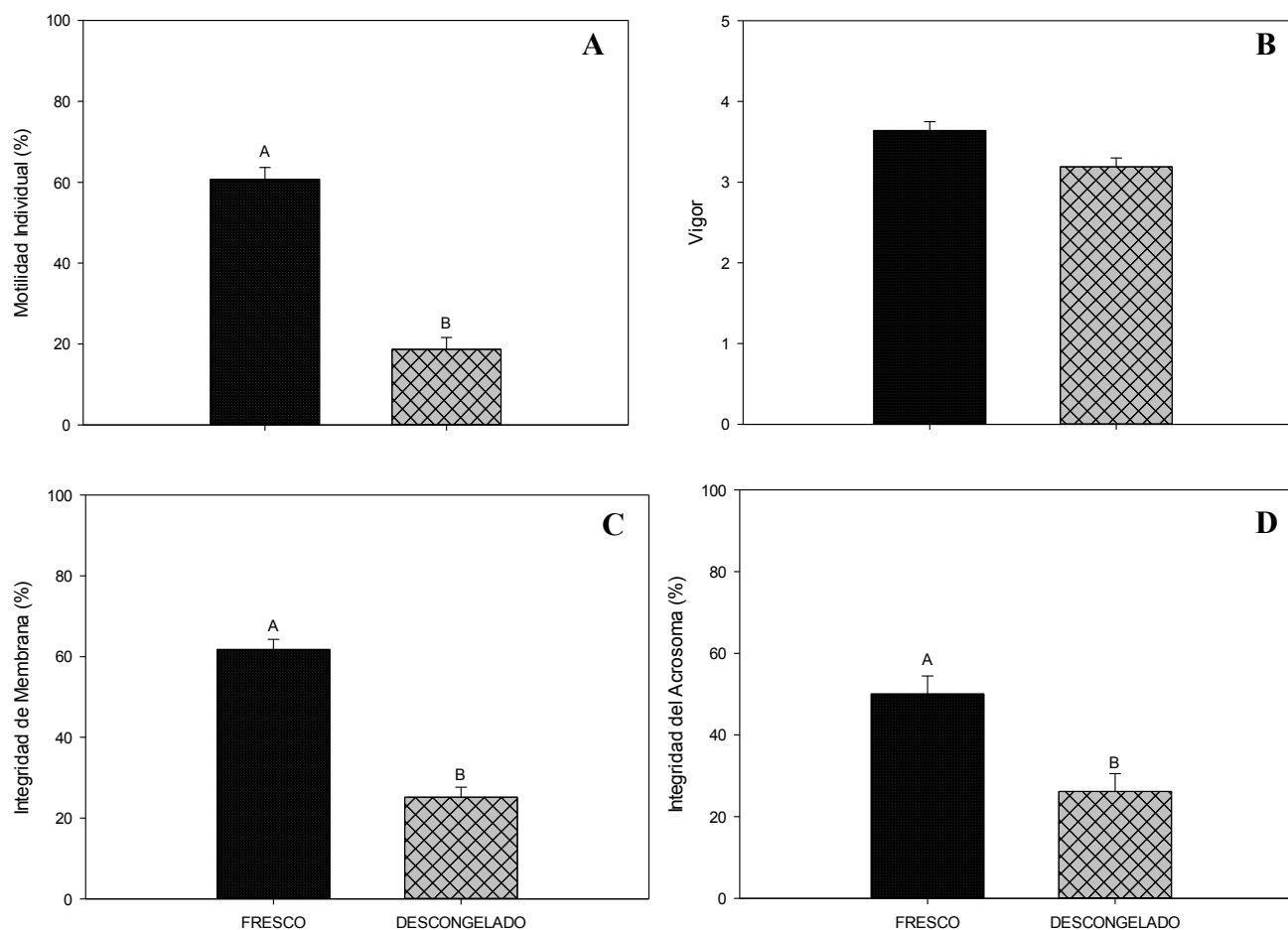


Figura 2.2. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados. Valores expresados en CMM \pm ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

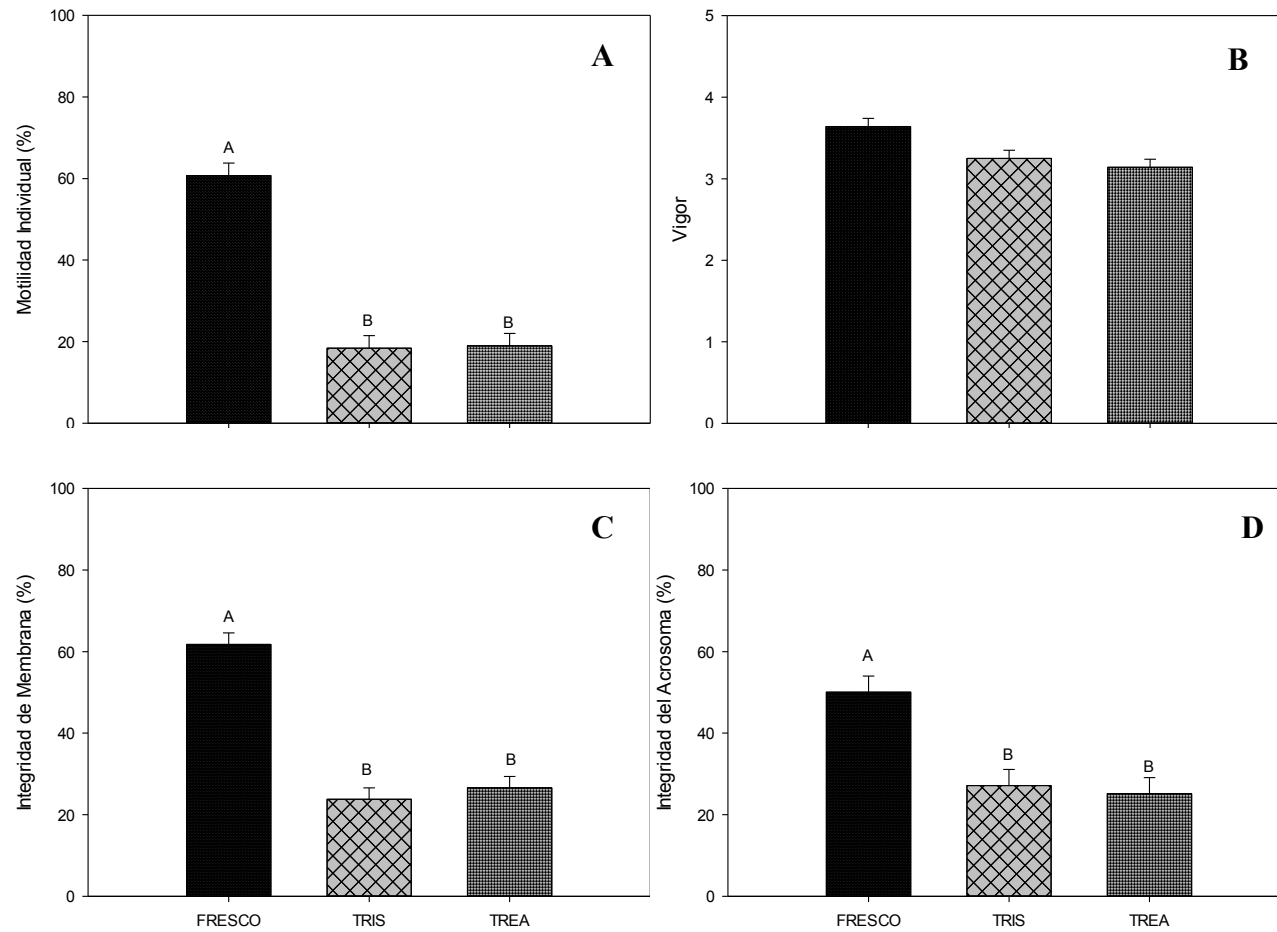


Figura 2.3. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados con TRIS y con TREA. Valores expresados en CMM \pm ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (P< 0,001).

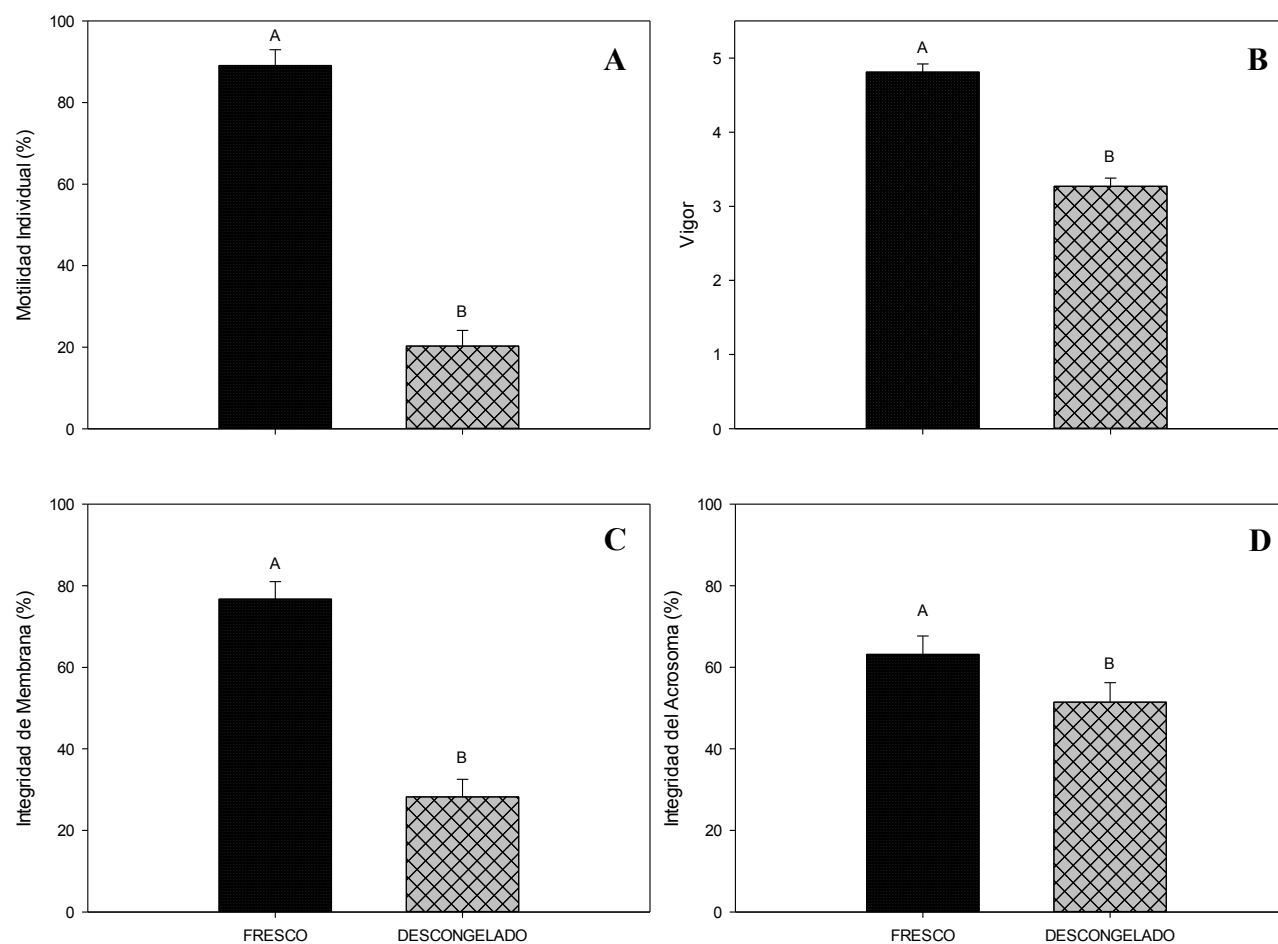


Figura 2.4. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre semen fresco y congelado-descongelado. Valores expresados en CMM±ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

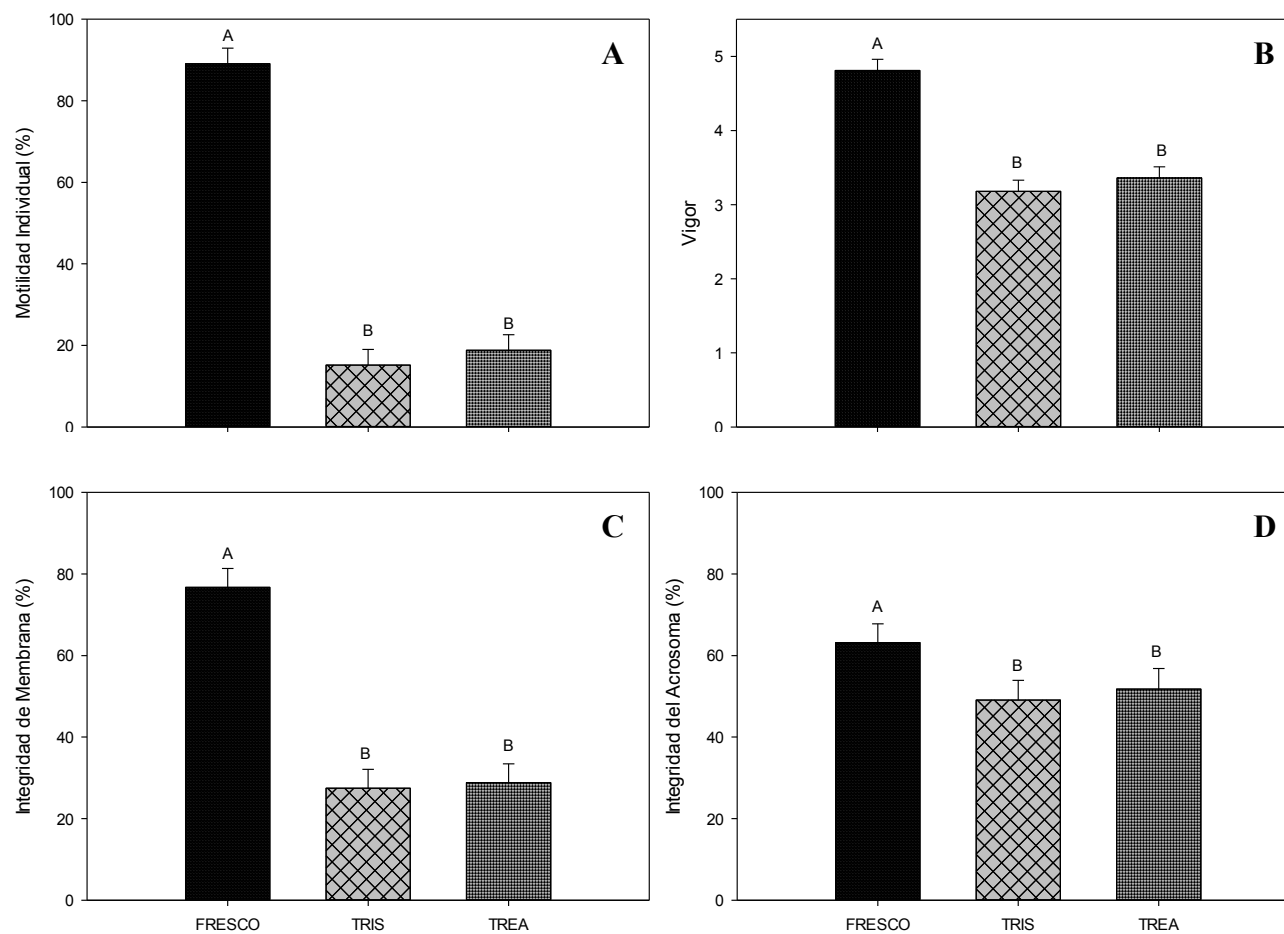


Figura 2.5. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre semen fresco y congelado-descongelado con TRIS y con TREA. Valores expresados en CMM±ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran un descenso significativo en todos los parámetros evaluados en los espermatozoides congelados-descongelados en comparación con los valores observados en fresco con los dos diluyentes utilizados. El descenso observado en nuestro trabajo en la MI fue superior al observado en felinos en otros estudios (Axner y col., 2004; Baran y col., 2004; Thuwanut y col., 2008; Mizutani y col., 2010; Chatdarong y col., 2009; Zambelli y col., 2010b; Vick y col., 2012; Villaverde y col., 2013; Jiménez Vaquero, 2013). El agregado de GLY previo a la congelación evitaría el efecto tóxico de esta sustancia durante el equilibrado. Este hecho podría ser el responsable de los valores obtenidos por Baran y col., quienes agregaron el GLY pre-congelado disminuyendo los efectos deletéreos del mencionado compuesto (Baran y col., 2004). Otros autores agregan el GLY en 2 pasos adicionando una concentración menor en la dilución inicial (3%) para luego adicionar una mayor cantidad (7%) pre-congelado, lo cual permitiría disminuir los efectos tóxicos del compuesto sobre la célula espermática (Axner y col., 2004; Tebet y col., 2006; Thuwanut y col., 2008). Así mismo, otros autores han obtenidos valores de MI al descongelado superiores a los nuestros (Tebet y col., 2006; Thuwanut y col., 2008; Thuwanut y col., 2009; Thuwanut y Chatdarong, 2009; Chatdarong y col., 2009; Villaverde y col., 2013). Sin embargo, en los mencionados trabajos se utilizó Equex en el diluyente Tris base, pudiendo el detergente ser el responsable del efecto benéfico observado en la MI. Por otro lado, la técnica utilizada en el proceso de congelación podría ser la responsable de estas diferencias. Es así que los trabajos realizados utilizando congelación con el método de CLONE, mostraron al descongelado valores de motilidad superiores a los observados en este trabajo (Axner y col., 2004; Thuwanut y col., 2008; Chatdarong y col., 2009). El uso de concentraciones de GLY menores a las utilizadas en nuestro trabajo también podría explicar las diferencias encontradas (Baran y

1 col., 2004; Thuwanut y col., 2008; Cocchia y col., 2010; Zambelli y col., 2010; Vick y col.,
2 2012, Jiménez Vaquero, 2013).

3 Otro factor a considerar sería el origen de los espermatozoides
4 (epididimales/seminales) sin embargo, en nuestro trabajo al igual que lo observado por Tebet
5 y col., no se encontraron diferencias en relación al origen espermático (Tebet y col., 2006).

6 En nuestro trabajo, en la IM de los espermatozoides criopreservados se observaron
7 efectos similares a los observados en la MI. Estos dos parámetros (MI e IM) resultaron ser los
8 más afectados por el proceso criopreservación. El descenso observado en la IM en nuestro
9 trabajo, al igual que lo ocurrido con la MI, fue superior al de otros autores (Axner y col.,
10 2004; Tebet y col., 2006; Thuwanut y col., 2008; Thuwanut y Chatdarong, 2009; Jiménez
11 Vaquero, 2013; Villaverde y col., 2013). Las diferencias observadas podrían atribuirse a los
12 factores discutidos para MI.

13 El efecto de la adición de TREA en el diluyente de congelación espermática fue
14 estudiado en diferentes especies, observándose una acción protectora en algunas de ellas. Sin
15 embargo en varias ocasiones los diluyentes utilizados poseen otros compuestos que pueden
16 influir en la protección durante el proceso de congelación-descongelación. (Woelders y col.,
17 1997; Hu y col., 2010; Reddy y col., 2010; Aisen y col., 2002; Aisen y col., 2005; Matzuoca y
18 col., 2006; Bucak y col., 2007; Tonieto y col., 2010; Jafaroghli y col., 2011; Aboagla y
19 Terada, 2003; Yildiz y col., 2000; Yamashiro y col., 2007; Savignone y col., 2007a; Stornelli
20 MA, 2004; Squires y col., 2004; Gutiérrez-Pérez y col., 2009; Hu y col., 2009; Dalimata y
21 Graham, 1997; Kozdrowski, 2009; Fernández-Santos y col., 2007; Sztein y col., 2001). En
22 concordancia con nuestros resultados, Stornelli no observó una mejora en la calidad
23 espermática al descongelado con la adición de TREA al diluyente de congelación en caninos
24 (Stornelli MA, 2004). En caninos el diluyente sin TREA mostró ser más eficaz en la

1 protección de los espermatozoides durante la congelación (Stornelli MA, 2004). Sin embargo,
2 otros autores si observaron un efecto protector de la TREA sobre los espermatozoides caninos
3 (Yildiz y col., 2000; Yamashiro y col., 2007). Estas diferencias podrían atribuirse a
4 variaciones en el protocolo de congelación, composición del diluyente, a las distintas
5 concentraciones de TREA incorporada al diluyente o la combinación de más de uno de estos
6 factores.

7 En contraposición a nuestros resultados en ovinos, porcinos, caprinos, bovinos y
8 bubalinos, el agregado de TREA al diluyente mejoró los parámetros seminales al
9 descongelado (Aisen, 2002; Aisen y col., 2005; Hu y col., 2009; Gómez-Fernández y col.,
10 2012; Gutiérrez-Pérez y col., 2009; Hu y col., 2010; Reddy y col., 2010). En ovinos, la TREA
11 ejerció efectos benéficos durante la congelación espermática, mejorando la motilidad, la
12 viabilidad y protegiendo de los daños causados por el estrés oxidativo (Aisen y col., 2002;
13 Aisen y col., 2005). Similares resultados se observaron en bovinos (Hu y col., 2010).

14 En concordancia con lo observado en ovinos y bovinos, y en contraposición a lo
15 observado en nuestro trabajo, en porcinos se observó efectos benéficos sobre la motilidad, IA,
16 viabilidad y fluidez de la membrana de los espermatozoides al usar TREA en el diluyente de
17 congelación (Hu y col., 2009; Gómez-Fernández y col., 2012; Gutiérrez-Pérez y col., 2009).
18 Sin embargo, las concentraciones utilizadas por los distintos autores en porcinos difieren de la
19 utilizada por nosotros en el felino (25, 50, 100, 200, 250 mOsm/L versus 3,3 mOsm/L). Así
20 mismo, la composición de los diluyentes fue diferente al utilizado por nosotros. En uno de los
21 trabajos se combinó Equex con TREA, mientras que las concentraciones de GLY fueron
22 inferiores a las nuestras; pudiendo atribuirse los mejores resultados a estas diferencias (Hu y
23 col., 2009; Gómez-Fernández y col., 2012; Gutiérrez-Pérez y col., 2009). En porcinos al igual
24 que lo descripto en ovinos y en caninos, las altas concentraciones de TREA (200 mOsm/L)

1 mostraron un efecto tóxico sobre los espermatozoides (Aisen y col., 2000; Stornelli MA,
2 2004; Hu y col., 2009).

3 En concordancia con nuestro trabajo, en el conejo la TREA no mejoró la calidad
4 espermática al descongelado (Kozdrowski, 2009). En esa especie, el agregado de 100
5 mOsm/L del disacárido mostró un efecto negativo sobre la motilidad al compararlo con
6 50mOsm/L de TREA y con el control que no contenía el azúcar. Sin embargo, en dicho
7 trabajo se reemplazó el GLY por DMSO lo que podría haber sido responsable de los
8 resultados observados (Kozdrowski, 2009).

9 Las diferencias en la composición de las membranas espermáticas en las distintas
10 especies de animales influyen en la tolerancia espermática a los cambios de osmolalidad del
11 medio durante la congelación-descongelación. Podemos concluir que la acción protectora de
12 la TREA es concentración dependiente (Aisen y col., 2002; Curry y Watson, 1994, Gómez-
13 Fernández y col., 2012). Algunos de los factores que pueden modificar la acción de TREA
14 adicionada al diluyente de congelación pueden ser además de los ya enumerados, la
15 concentración de otros crioprotectores en el diluyente, la tasa de enfriado, el método
16 recolección y dilución del semen, la combinación de TREA con otros crioprotectores (Aisen y
17 col., 2002; Uysal y Bucak, 2009; Cirit y col., 2013). A estos factores podemos sumarle la
18 dificultad para comparar los resultados obtenidos en los diferentes laboratorios en la
19 evaluación de semen y fertilidad debido al error interlaboratorios y variaciones de
20 metodologías de trabajo (Rodriguez-Martinez, 2003; Gillan y col., 2005; Graham y Mocé,
21 2005; Mocé y Graham, 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos en diferentes estudios
22 sugieren que 100mOsm/L sería una concentración que ejerce efecto protector en distintas
23 especies.

1 Nuestros resultados muestran, en contraposición a lo planteado en la hipótesis, que el
2 agregado de 3,3mOsm/L (0,312%) de TREA incorporados al diluyente sin modificar la
3 osmolalidad del mismo, no mejora la supervivencia espermática al descongelado en felinos
4 bajo las condiciones experimentales previamente descritas. Los trabajos realizados en las
5 especies en las cuales la TREA mostró efecto protector sobre los espermatozoides
6 congelados-descongelados, utilizaron concentraciones de este disacárido superiores a las
7 incorporadas por nosotros en el diluyente. Es así que tal vez los EF requieran una
8 concentración mayor de TREA, sin que esta genere una hipertonidad en el medio que llegue
9 a producir efectos deletéreos sobre la célula espermática, para de esta manera evidenciar los
10 efectos benéficos del agregado de este azúcar.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

CAPITULO III

EFEECTO DE LA ADICIÓN DE DIMETILFORMAMIDA AL DILUYENTE EN REEMPLAZO DE PARTE DEL GLICEROL SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA POST DESCONGELACIÓN EN FELINOS

INTRODUCCION

Numerosos crioprotectores han sido estudiados para la congelación de semen en distintas especies. Los crioprotectores ejercen su acción mediante diferentes mecanismos, pudiendo clasificarse como penetrantes o intracelulares y no penetrantes o extracelulares (Meryman, 1971). Se ha sugerido que el crioprotector ideal debe tener bajo peso molecular, ser soluble en agua y producir mínima toxicidad (Ashwood-Smith, 1987; Pegg, 2007).

El GLY es el crioprotector más comúnmente utilizado en la criopreservación de semen de muchas especies. Sin embargo, puede inducir cambios en los fosfolípidos de membrana alterando la estabilidad y permeabilidad de la misma, evento que conduce a una disminución de la longevidad espermática (Watson, 1995; Hay y col., 1997). Así mismo puede inducir la capacitación y en consecuencia disminuir la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados (Watson, 1995).

Los efectos deletéreos del GLY son dependientes de la especie. Los espermatozoides de conejos, ovinos, porcinos, equinos, aves y peces han mostrado una mayor susceptibilidad a los efectos tóxicos de este crioprotector (Dalimata y Graham, 1997; Slavik, 1987; Abdelhakeam y col., 1991; Neville y col., 1970; Wilmut y Polge, 1974; Demick y col., 1976; Gomes y col., 2002; Allem y Bobr, 1955; Hammerstedt y Graham, 1992; Neville y col.,

1 1971). Este hecho ha impulsado la búsqueda de nuevos crioprotectores para la
2 criopreservación seminal.

3 Se ha evaluado el comportamiento espermático frente a diferentes concentraciones de
4 GLY en el felino doméstico. Villaverde y col., observaron escaso efecto protector sobre la
5 motilidad espermática, utilizando 3% de GLY en comparación con 5 y 7%. En
6 contraposición, 7% de GLY mostró una disminución de la integridad acrosómica en
7 comparación con 3% de GLY (Villaverde y col., 2013). Nelson y col., compararon el efecto
8 crioprotector de 4 y 8% de GLY en semen felino observando un efecto protector sobre la
9 motilidad al utilizar 4% del crioprotector (Nelson y col., 1999). Sin embargo, Baran y col., no
10 encontraron diferencias en la motilidad y morfología espermática al comparar el uso de 3 ó
11 4% de GLY incorporados al diluyente de congelación en felinos. Debe considerarse que en
12 este trabajo el GLY fue adicionado luego de la estabilización, pre-congelación y no en la
13 dilución inicial de la muestra como fue realizado en el trabajo de Nelson (Baran y col., 2004).

14 Las amidas son moléculas de bajo peso molecular y de baja viscosidad por lo que
15 penetran rápidamente las membranas, disminuyen el punto de congelación pudiendo reducir
16 los daños asociados al estrés osmótico, generando así un ambiente menos dañino para el
17 espermatozoide (Lopes y col., 2009; Ball y Vo, 2001). Asimismo, la molécula hidrofílica de
18 las amidas tiene gran interacción con el agua, lo que reduce la formación intracelular de
19 cristales de hielo (Bianchi y col., 2008). Las amidas han mostrado ser una alternativa para
20 proteger al espermatozoide durante la criopreservación seminal en algunas especies
21 (Alvarenga y col., 2005; Kashiwazaki y col., 2006; Lopes y col., 2009; Medeiros y col., 2002;
22 Varela Junior y col., 2012; Mesa y Henao, 2012; Tselutin y col., 1999).

23 En los equinos, el uso de amidas es considerado una alternativa para mejorar los
24 parámetros seminales al descongelado en aquellos animales que son definidos como “malos

1 congeladores” (Alvarenga y col., 2005). En esta especie, la DMF sola o en combinación con
2 GLY, permite obtener una motilidad significativamente más alta en comparación con el uso
3 de GLY como único crioprotector agregado al diluyente de congelación (Squires y col.,
4 2004). Se han realizado estudios que muestran que el semen congelado con DMF es capaz de
5 mantener durante más tiempo la viabilidad espermática en el tracto genital de las yeguas
6 (Alvarenga y col., 2005). En otras especies como porcinos, peces y aves se ha criopreservado
7 exitosamente semen con el agregado de amidas al diluyente de congelación (Tselutin y col.,
8 1999; Bianchi y col., 2008; Varela Junior y col., 2012). Sin embargo, trabajos realizados en
9 los caninos indican que el uso de amidas no mejoraría la calidad espermática al descongelado
10 (Savignone y col., 2007b; Lopes y col., 2009; Filho y col., 2011). En concordancia con lo
11 observado en caninos, en caprinos Bezerra y col., no observaron efectos benéficos de DMF en
12 reemplazo del GLY en el diluyente de congelación (Bezerra y col., 2011).

13 Lo anteriormente expuesto muestra el efecto benéfico obtenido con el agregado de
14 amidas al diluyente de congelación en algunas especies (Alvarenga y col., 2005; Kashiwazaki
15 y col., 2006; Lopes y col., 2009; Medeiros y col., 2002; Varela Junior y col., 2012; Mesa y
16 Henao, 2012; Tselutin y col., 1999; Gomes y col., 2002; Bianchi y col., 2008). Sin embargo,
17 no hay estudios que muestren la acción de las amidas sobre los EF durante el proceso de
18 criopreservación.

19 Como puede observarse, en las diferentes especies estudiadas, se evidencian
20 variaciones en la respuesta de los espermatozoides al ser criopreservados con distintos tipos y
21 concentraciones de crioprotectores. Estas variaciones pueden atribuirse a la diferente
22 composición lipídica de las membranas en cada especie en particular. Es así que la cantidad y
23 tipo de fosfolípidos podría interferir en la estabilidad de las membranas durante la
24 criopreservación (Lopes y col., 2009).

El objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de la adición de DMF al diluyente Tris sobre la supervivencia espermática al descongelado en felinos. La hipótesis fue que la incorporación al diluyente Tris de DMF permitirá reducir los efectos tóxicos del GLY sobre los EE y espermatozoides seminales durante el proceso de congelación-descongelación.

11 Con el fin de cumplir con el objetivo planteado se diseñaron dos experimentos.

Se utilizaron felinos (n=16) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual, utilizando un diseño aleatorio (Petersen, 1985). Los felinos utilizados fueron incluidos en un plan de control urbano de la reproducción. Luego de la orquiectomía bilateral, los testículos y EPI de cada ANI se colocaron inmediatamente en SF con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, mantenidos a temperatura ambiente y enviados rápidamente al laboratorio (Slatter, 1993).

Los EPI fueron procesados dentro de las 4 hs posteriores a la orquiectomía, tiempo que se tarda desde la cirugía hasta la llegada de los órganos al laboratorio. Se separaron las colas de los EPI y se atemperaron en un baño termostatzado a 37°C por 10 minutos en 0,75 ml de Tris base (Tris 3,025g, ácido cítrico 1,27 g, fructosa 1,25 g, agua destilada csp 100 ml). La recuperación de los EE se realizó por cutting de la cola del epidídimo (Tittarelli y col., 2006).

1 Pruebas de contrastación del material seminal *in vitro*:

2 Los EE obtenidos en Tris base fueron colocados en un baño termostatzado a 37°C y
3 sometidos a las mismas pruebas de contrastación descriptas en el experimento 1 del capítulo
4 II.

5 Para realizar la congelación de los EE se utilizaron dos diluyentes (n=2) diferentes.
6 Los EE recuperados se mezclaron con un volumen calculado de cada uno de los diluyentes
7 descriptos para obtener una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml. Se utilizó un
8 diluyente TRIS sin el agregado DMF (TRIS) o con el agregado de 0,5% de DMF y 4,5% de
9 GLY (DMF). El diluyente TRIS que se utilizó tenía la siguiente composición: Tris (2,4 g),
10 ácido cítrico (1,4 g), fructosa (0,6 g), GLY (5 g), yema de huevo (20% v/v), penicilina sódica
11 (0,06 g), sulfato de estreptomicina (0,1 g), y agua destilada (csp 100ml; Zambelli y col.,
12 2002). Luego de un tiempo de equilibración de 1 hora a 4°C, los EE diluidos fueron
13 envasados en pajuelas de 0,25 ml y congelados de acuerdo a la técnica descripta por Axner
14 (Axner y col., 2004). La descongelación de los EE se realizó a 37 °C durante 1 minuto
15 (Stornelli MA, 2004).

16 Los EE congelados-descongelados fueron sometidos a las mismas pruebas de
17 contrastación microscópica que los EE frescos.

18

19 **Experimento 4**

20 Se utilizaron felinos (n=4) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un
21 peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual, utilizando un diseño aleatorio (Petersen, 1985). Los
22 felinos fueron alojados en una habitación acondicionada, en jaulas individuales, alimentados
23 con alimento balanceado (Fit 32[®], Royal Canin, Argentina) y agua *ad-libitum*. Los ANI se
24 encontraban sometidos a un régimen de luz artificial incandescente con luces de 100 W a

1 aproximadamente 50 cm de los felinos. Para mantener la producción espermática durante el
2 estudio se alternaron CFL con CFC (Nuñez y col., 2012). Los felinos fueron anestesiados con
3 ketamina (25 mg/kg i.m; Ketamina 50[®], Holliday-Scott SA, Argentina, xylazina (1mg/kg i.m;
4 Kensol[®] Köning SA, Argentina) y atropina (0.04 mg/kg i.m.; Slatter, 1993) y sometidos cada
5 15 días a electroeyaculación (Stornelli MA y col., 2007a; Nuñez y col., 2012). La
6 electroeyaculación fue realizada mediante la técnica descrita en el experimento 1 del
7 capítulo II. Se obtuvieron un total de 8 eyaculados, 2 por cada ANI.

8 El semen obtenido fue congelado con los diluyentes y la metodología descrita en el
9 experimento 3. Se utilizó la misma metodología de descongelación. El semen fresco y
10 congelado-descongelado fue sometido a las mismas pruebas de contrastación descritas en el
11 experimento 1 del capítulo II.

12

13 **Análisis estadístico**

14 Los datos fueron analizados mediante ANOVA con el PROC GLM de SAS[®] (SAS,
15 2003).

16

17 **Marco bioético del uso de animales**

18 Los experimentos se realizaron respetando las mismas consideraciones bioéticas que
19 en especificadas en el experimento 1 del capítulo II.

20

21

1

RESULTADOS

2

3

4

5

6

En el experimento 3, el porcentaje de MI, VI, IM e AI en los EE frescos fue superior al de los EE congelados-descongelados ($54,06 \pm 2,54$ vs $11,40 \pm 2,54$; $3,96 \pm 0,17$ vs $3,29 \pm 0,17$; $59,57 \pm 2,37$ vs $11,68 \pm 2,21$; $45,62 \pm 3,32$ vs $26,93 \pm 3,22$; $P < 0.001$; Figura 3.1.A-D). El porcentaje de MI, VI, IM y AI fueron similares entre los EE congelados-descongelados con TRIS o con DMF (Figura 3.2.A-D).

7

8

9

10

11

En el experimento 4, el porcentaje de MI, VI, IM e AI en el semen fresco fue superior al del semen congelado-descongelado ($91,66 \pm 1,14$ vs $16,38 \pm 1,14$; $4,94 \pm 0,06$ vs $3,52 \pm 0,06$; $76,77 \pm 3,38$ vs $10,72 \pm 3,38$; $71,33 \pm 3,24$ vs $33,05 \pm 3,24$; $P < 0.001$; Figura 3.3.A-D). El porcentaje de MI, VI, IM y AI fueron similares entre el semen congelado-descongelado con TRIS o con DMF (Figura 3.4.A-D).

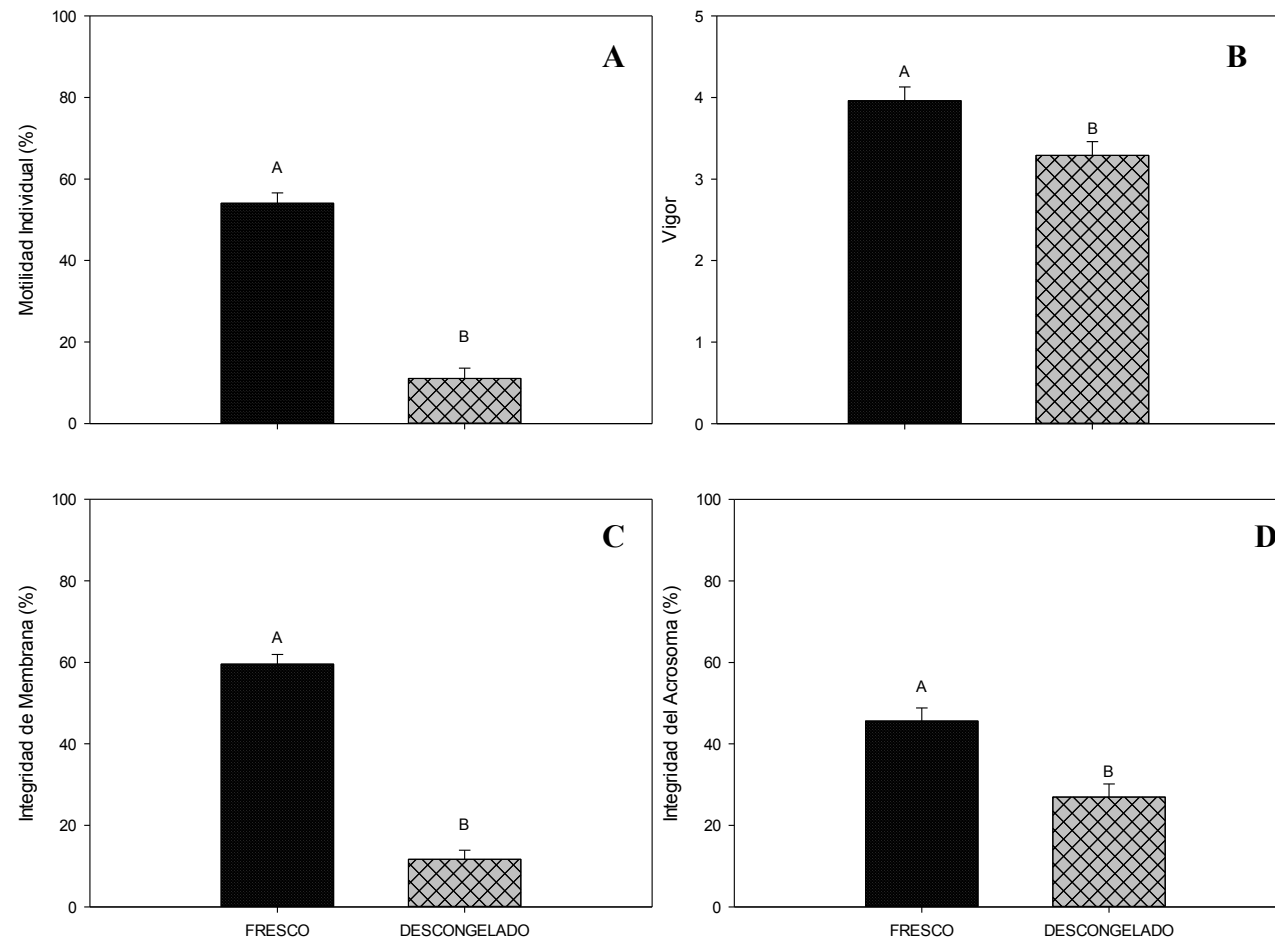


Figura 3.1. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados. Valores expresados en CMM \pm ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

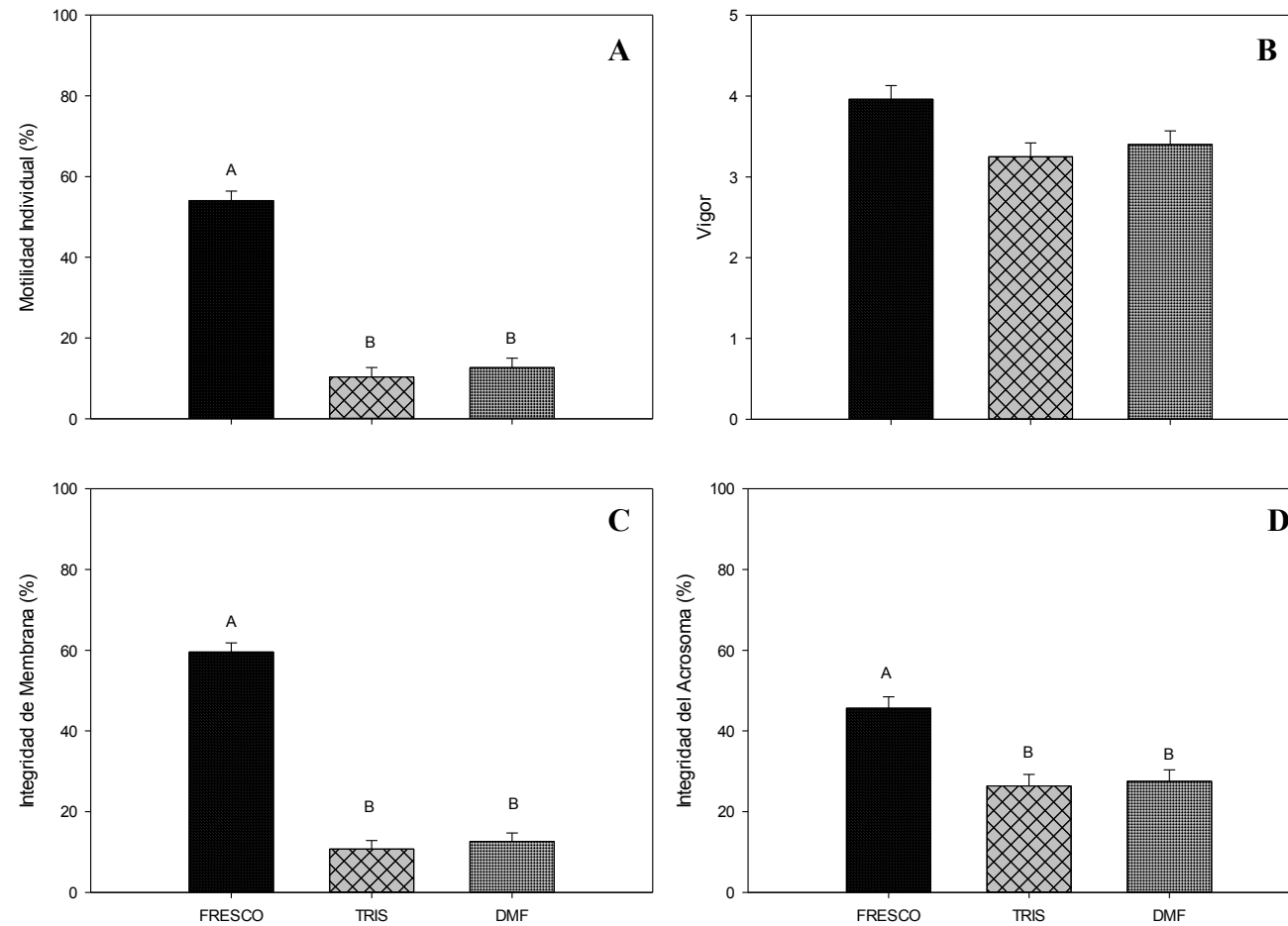


Figura 3.2. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre espermatozoides epididimales frescos, y congelados-descongelados con TRIS y con DMF. Valores expresados en $CMM \pm ES$. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

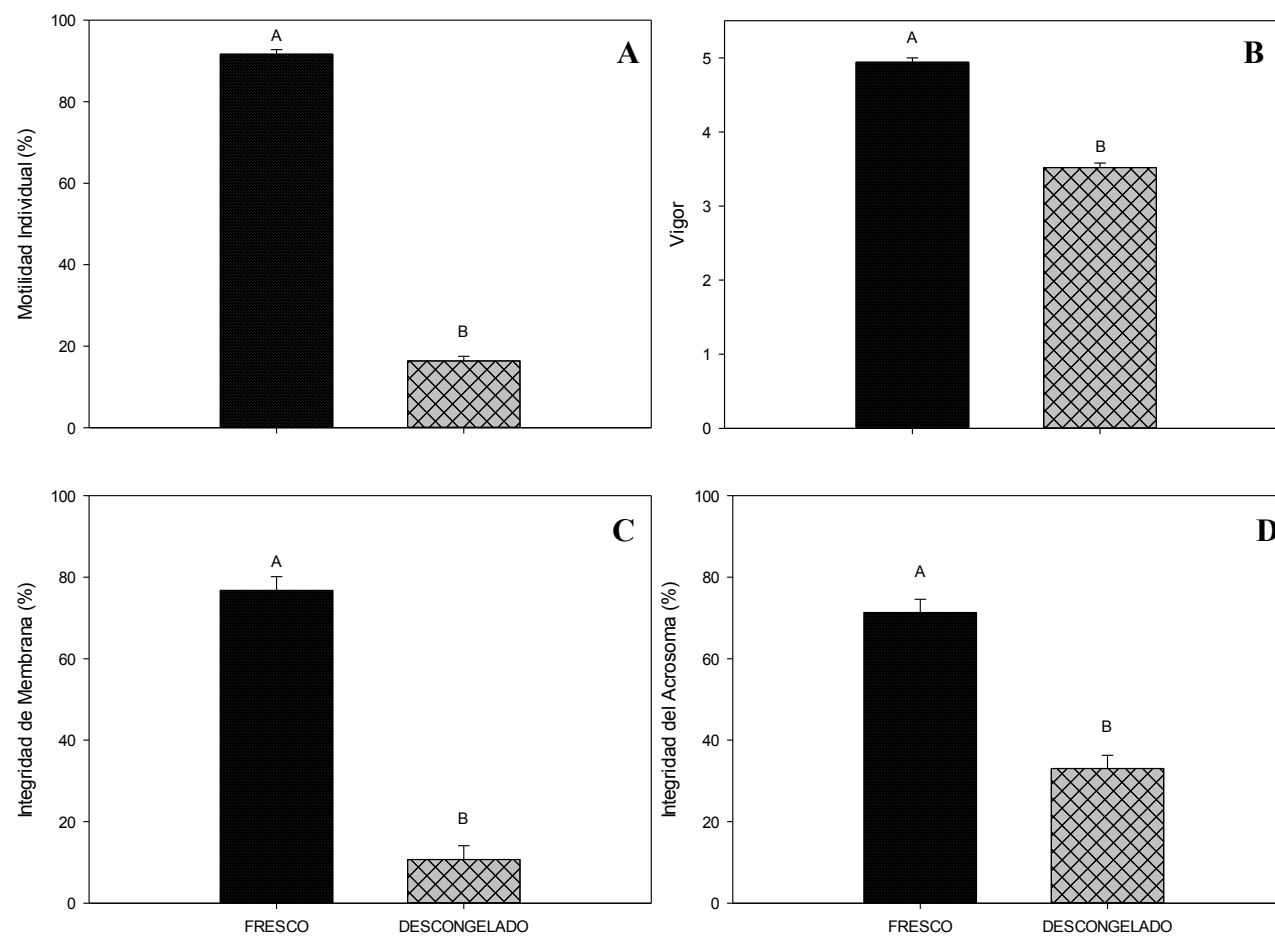


Figura 3.3. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre semen fresco y congelado-descongelado. Valores expresados en CMM±ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

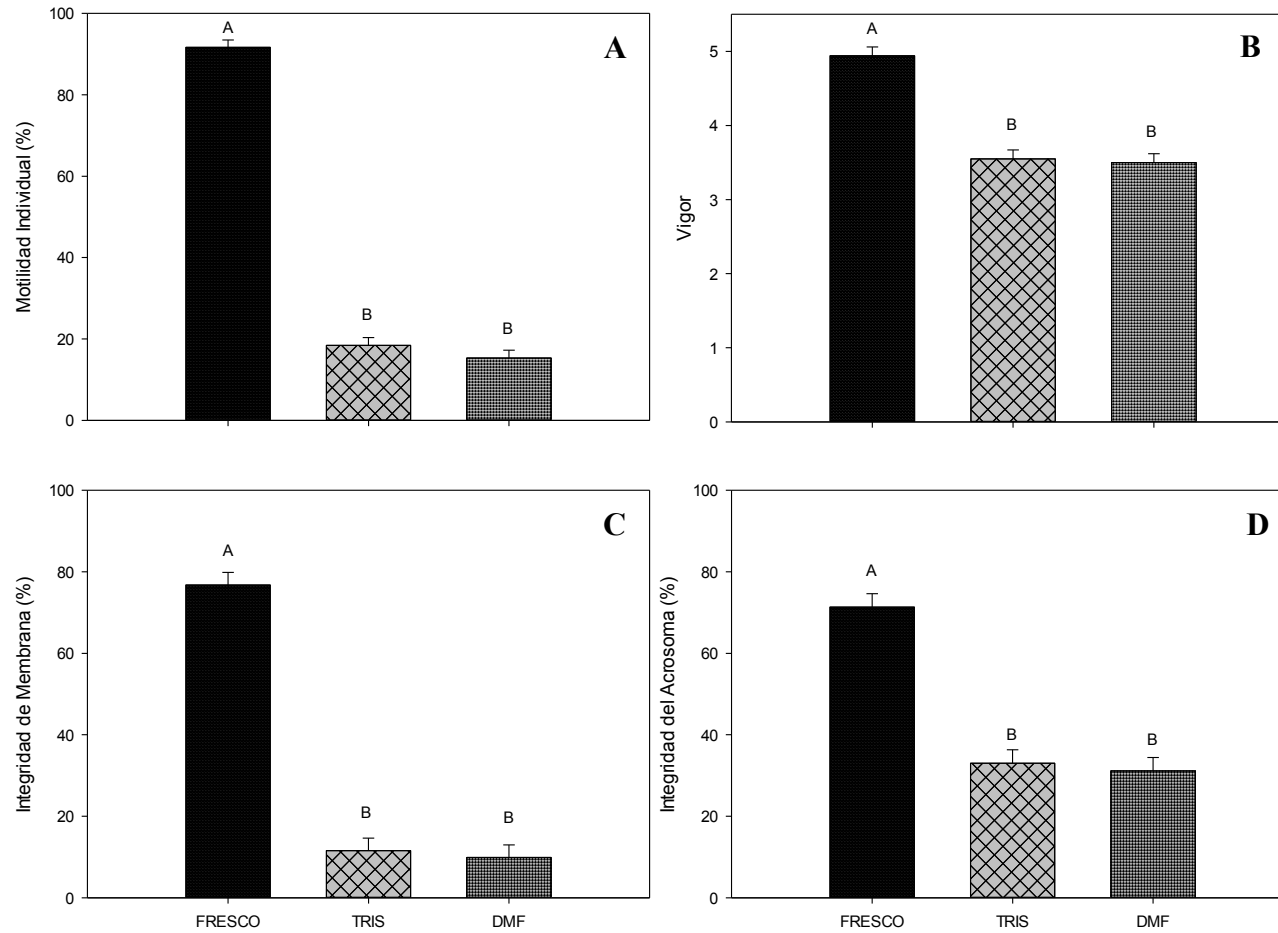


Figura 3.4. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre semen fresco y congelado-descongelado con TRIS y con DMF. Valores expresados en CMM±ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Durante el proceso de congelación-descongelación los espermatozoides son sometidos a diferentes tipos de estrés que afectan la supervivencia espermática dañando su estructura y metabolismo, lo cual se ve reflejado en una menor motilidad e integridad de las membranas al descongelado. Este hecho se ha observado en nuestro trabajo y fue descrito previamente por otros autores (Barbas y Mascarenhas, 2009; Purdy, 2006).

Nuestros resultados muestran un descenso significativo de la MI e IM en los espermatozoides congelados-descongelados en comparación con los valores observados en fresco. Así mismo, el descenso observado en la MI fue superior al observado por otros autores (Axner y col., 2004; Baran y col., 2004; Thuwanut y col., 2008; Mizutani y col., 2010; Chatdarong y col., 2009; Zambelli y col., 2010b; Vick y col., 2012; Villaverde y col., 2013; Jiménez Vaquero, 2013). Efectos similares a los observados en la MI, ocurrieron en nuestro trabajo en la IM de los EF criopreservados. Estos dos parámetros (MI e IM) resultaron ser los más afectados por el proceso criopreservación. El descenso observado en la IM en nuestro trabajo, al igual que lo ocurrido con la MI, fue superior al de otros autores (Axner y col., 2004; Tebet y col., 2006; Thuwanut y col., 2008; Thuwanut y Chatdarong, 2009; Jiménez Vaquero, 2013; Villaverde y col., 2013). Las diferencias observadas con otros autores podrían atribuirse a los factores discutidos en el experimento 1 del capítulo II.

El uso de DMF en reemplazo del GLY o parte del mismo fue estudiado en diferentes especies (Savignone y col., 2007b; Lopes y col., 2009; Futino y col., 2010; Filho y col., 2011; Alvarenga y col., 2005; Squires y col., 2004; Hanada y Nagase, 1980; Bezerra y col., 2011; Bianchi y col., 2008; Vidament y col., 2002; Medeiros y col., 2002; Gomes y col., 2002; Gibb y col., 2010; Mesa y col., 2012)

1 En concordancia con nuestros resultados, en caninos el reemplazo de parte del GLY
2 por DMF en el diluyente de congelación no mejoró los parámetros evaluados al descongelado
3 (MI, VI, IM y AI). En caninos el diluyente sin DMF mostró ser más eficaz en la protección de
4 los espermatozoides durante la congelación (Savignone y col., 2007b). El mismo efecto fue
5 observado por otros autores en caninos (Lopes y col., 2009; Futino y col., 2010; Filho y col.,
6 2011). Así mismo estudios realizados en ovinos mostraron que el reemplazo del GLY por
7 DMF no mejoró los parámetros seminales al descongelado (Bezerra y col., 2011).

8 En contraposición con lo observado por nosotros en felinos, en equinos diferentes
9 autores coinciden en sus hallazgos al observar una mejor motilidad espermática al
10 descongelado con el uso de DMF en comparación con GLY (Gomes y col., 2002; Gibb y col.,
11 2010; Mesa y col., 2012; Medeiros y col., 2002). Otros autores, observaron además de un
12 efecto protector sobre la MI una mejora en la IM al descongelado al utilizar en el diluyente
13 DMF (Gomes y col., 2002; Mesa y col., 2012). En concordancia con lo observado en equinos
14 y en contraposición a lo observado en nuestro trabajo, en porcinos observaron efectos
15 benéficos sobre la motilidad e IM al usar DMF en reemplazo del GLY (Bianchi y col., 2008).
16 En el mencionado trabajo se observó que 5% de DMF ejerció mayor efecto protector sobre la
17 motilidad e IM que 7%, mostrando que altas concentraciones de amidas podrían tener efectos
18 tóxicos (Bianchi y col., 2008). Efectos similares a lo observado en porcinos se observaron en
19 conejos, en los que la DMF mostró mayor efecto protector sobre la motilidad al compararla
20 con el GLY. Sin embargo, con el uso de altas concentraciones de esta amida se evidenciaron
21 efectos tóxicos (Hanada y Nagase, 1980). A diferencia de lo observado en porcinos y conejos,
22 en peces altas concentraciones (8%, 11%) de DMF mostraron ser eficientes en la preservación
23 espermática durante la congelación (Varela Junior y col., 2012).

1 Se puede observar que en aquellas especies en las cuales la DMF ejerció efectos
2 benéficos las concentraciones utilizadas de esta amida fueron superiores a las usadas en
3 nuestro trabajo (Alvarenga y col., 2005; Squires y col., 2004; Vidament y col., 2002; Bianchi
4 y col., 2008, Varela Junior y col., 2012). Alvarenga y col., mostraron que 5% de DMF es una
5 concentración que ejerce efectos protectores sobre los espermatozoides criopreservados en
6 equinos (Alvarenga y col., 2005). Similares resultados obtuvieron Squires y col., quienes
7 lograron buenos resultados con el uso de 5 y 7,5% de DMF (Squires y col., 2004). Vidament y
8 col., consideraron más apropiado para congelar semen en equinos una concentración de 2% de
9 DMF que 1, 3 y 5%. Por otro lado cuando se combinó 3 ó 5% de GLY con 5% de DMF la
10 motilidad fue inferior que cuando la combinación se realizó con porcentajes menores de
11 ambos crioprotectores (1 ó 3% de DMF con 1 ó 3% de GLY, Vidament y col., 2002).

12 Como se mencionara anteriormente, las diferencias en la composición de las
13 membranas espermáticas de las diferentes especies de animales influyen en la supervivencia
14 espermática durante la congelación-descongelación. Así mismo la concentración del
15 crioprotector usado en la composición del diluyente de congelación es uno de los factores que
16 afecta la supervivencia espermática al descongelado. La concentración óptima de GLY para la
17 supervivencia de los espermatozoides criopreservados como hemos visto, depende de varios
18 factores pudiendo ser influenciada por otros componentes del diluyente, por las tasas de
19 enfriado y método de congelación-descongelación utilizados. Estos factores también podrían
20 influir en los resultados obtenidos en este trabajo y deben ser considerados.

21 Nuestros resultados muestran, en contraposición a lo planteado en la hipótesis que el
22 agregado de 0,5% de DMF en reemplazo de parte del GLY no mejora la supervivencia
23 espermática al descongelado en felinos bajo las condiciones experimentales previamente
24 descriptas. Los trabajos realizados en las especies en las cuales la DMF mostró efecto

1 protector sobre los espermatozoides congelados-descongelados, utilizaron concentraciones de
2 DMF superiores a las utilizadas por nosotros. En nuestro trabajo hemos reemplazado un 10%
3 de GLY por DMF, quizás los EF requieran el reemplazo de un mayor porcentaje de GLY por
4 amidas para evidenciar los efectos benéficos del agregado de esta sustancia.

CAPITULO IV

EFEECTO DE LA ADICIÓN DE DODECIL SULFATO DE SODIO A UN DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA POST DESCONGELACIÓN EN FELINOS

INTRODUCCIÓN

Los numerosos estudios realizados en criopreservación espermática han llevado al conocimiento que las membranas plasmática y acrosomal sean consideradas el principal sitio de daño durante el proceso de criopreservación (Maxwell y Watson, 1996; Prathalingam y col., 2006). La desestabilización que sufren las membranas durante la congelación-descongelación ha conducido diversas investigaciones dirigidas a la búsqueda de un mecanismo estabilizante que intervenga en la fluidez de la membrana y proteja al espermatozoide durante la criopreservación (Watson, 1995).

El Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), es un detergente que agregado al diluyente de congelación actúa protegiendo a la membrana plasmática durante la criopreservación. Se ha observado que el agregado de pequeñas cantidades de SDS al diluyente mejora la motilidad espermática e integridad acrosómica durante la congelación-descongelación (Pursel y col., 1978). Arriola y Foote, observaron que para el semen bovino la cantidad óptima de SDS varía proporcionalmente a la cantidad de yema de huevo agregada del diluyente (Arriola y Foote, 1987). Sin embargo, la adición al diluyente de altos porcentajes de detergente afecta la estabilidad de las membranas plasmática y acrosomal (Stornelli MA, 2004).

Se ha comprobado la acción del SDS sobre las lipoproteínas de la yema de huevo mejorando el efecto crioprotector de los diluyentes de semen en algunas especies (Arriola y

1 Foote, 1987; Peña y Linde-Forberg, 2000; Rota y col., 1997; Pursel y col., 1978, Martin y
2 col., 1979; Tekin, 1982; Strohemeyer, 1988; Penfold y Moore, 1993; Bencharif y col., 2012).
3 El efecto benéfico del Equex STM Paste, el cual contiene SDS, es mayor cuando los
4 espermatozoides son expuestos al mismo inmediatamente antes de la congelación y no
5 durante el período de equilibración (Holt y col., 1998). De acuerdo con este concepto, se ha
6 podido observar que incorporar el Equex pos estabilización, en un segundo paso de dilución
7 durante el proceso de criopreservación ha sido beneficioso en comparación con la inclusión
8 del detergente al inicio de la dilución o pre estabilización en la congelación de semen en el
9 felino doméstico (Buranaamnuay, 2015).

10 En caninos la incorporación de Equex mejoró la termoresistencia, este efecto fue más
11 marcado al incorporar el detergente previo al congelado y no durante el equilibrado (Peña y
12 Linde-Forsberg, 2000). Otros trabajos demostraron que la adición de Orvus ES Paste (OEP),
13 que contiene SDS, al diluyente de congelación en caninos aumentaba la motilidad espermática
14 al descongelado y protegió los acrosomas comparado con un diluyente que no contenía OEP
15 (Nizanski y col., 2001; Peña y Linde-Forsberg, 2000; Peña y col., 2003; Rota y col, 2000;
16 Tsuitsui y col., 2000a, b). Rota y col., pudieron observar conjuntamente con el aumento de la
17 motilidad y la viabilidad, un efecto benéfico sobre la membrana plasmática en el semen
18 canino criopreservado (Rota y col., 1997). En esta especie se vió que al agregar el detergente
19 no se producía la hiperactivación espermática al descongelado que si se observaba cuando no
20 se lo incluía en el diluyente (Peña y Linde-Forsberg, 2000). Este hecho puede indicar que el
21 Equex sería capaz de prevenir o reducir los cambios similares a la capacitación que acontecen
22 durante el proceso de criopreservación (Axner y col., 2004). El agregado de Equex STM Paste
23 en concentraciones de 2-2,5%, permitió detectar mediante el uso de microscopía electrónica
24 una mayor cantidad de alteraciones ultraestructurales en el espermatozoide que cuando se

1 agrego 1-1,5% de SDS al diluyente de congelación en caninos (Jurado y col., 2005; Stornelli
2 MA y col., 2004b; Stornelli MC y col., 2005; Stornelli MA y col., 2006). Por lo tanto, altas
3 concentraciones de SDS no mejorarían la protección, ya que una vez que el detergente actuó
4 sobre la totalidad de los lípidos de la yema de huevo presente en el diluyente actuaría sobre
5 los fosfolípidos de la membrana celular, aumentando los daños ultraestructurales de los
6 espermatozoides (Stornelli MA, 2004; Jurado y col., 2005).

7 En porcinos el agregado de 1-1,5% de OEP mostró un efecto benéfico sobre
8 espermatozoides criopreservados, mejorando la motilidad al descongelado y protegiendo los
9 acrosomas durante el proceso de congelación-descongelación (Pursel y col., 1978). Kato y
10 col., utilizaron un diluyente con 1,2 a 1,6 mg/ml de SDS en lugar de OEP y obtuvieron
11 resultados similares en el porcentaje de acrosomas normales y motilidad progresiva (Kato y
12 col., 1990). Efectos similares se observaron en otras especies como equinos, caprinos, ciervos
13 y bovinos (Aboagla y col., 2004a b; Ahmad y Foote, 1986; Martin y col., 1979; Cheng y col.,
14 2004).

15 Se han usado distintos protocolos para criopreservar EF, sin embargo en los mismos se
16 han observado gran cantidad de células con daños acrosomales y baja motilidad (Platz y col.,
17 1978; Hay y Goodrowe, 1993; Wood y col., 1993; Lengwinat y Blottner, 1994; Stackeck y
18 col., 1994; Schafer y Holzman, 2000; Zambelli y col., 2002). Con el fin de proteger los
19 acrosomas y prevenir los procesos similares a la capacitación que ocurren durante la
20 criopreservación espermática, se incorporaron detergentes como el SDS al diluyente de
21 congelación en felinos (Siemieniuch y Dubiel, 2006). En esta especie el Orvus, el Equex STM
22 paste y el SDS han sido usados obteniendo buenos resultados (Axner y col., 2004; Chatdarong
23 y col., 2008; Zambelli y col., 2010b; Mizutani y col., 2010). Mizutani observó que con el
24 agregado de 3% de SDS y 4% de Orvus los parámetros seminales pos-descongelación fueron

1 similares (Mizutani y col., 2010). En el mencionado trabajo el agregado de 3% de SDS
2 producía mayores porcentajes de espermatozoides viables al descongelado que 2% y 4%,
3 siendo los resultados obtenidos con 2% inferiores a 3% y 4%. El agregado de 0,5% de Equex
4 mejoró la AI de los EE felinos criopreservados sobre el diluyente sin el detergente. Sin
5 embargo, redujo la motilidad y longevidad durante el período de incubación (Axner y col.,
6 2004). En concordancia, Peña y Linde-Forsberg, proponen que si bien el SDS previene o
7 reduce los cambios similares a la capacitación la exposición prolongada al mismo podría tener
8 efectos negativos sobre los espermatozoides (Peña y Linde-Forsberg, 2000). Una manera de
9 evitar los efectos nocivos del SDS sería realizar la congelación en dos pasos de dilución, es
10 decir agregar el diluyente con el detergente justo antes del empaquetado (Stornelli MA, 2004).

11 La hipótesis fue que el agregado de 0,25 % de SDS al diluyente TRIS durante la
12 congelación (posestabilización) de EF permitiría obtener altos IC manteniendo las membranas
13 de la célula espermática más estables.

14 El objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de la adición de SDS al
15 diluyente Tris base sobre la supervivencia espermática al descongelado. La hipótesis fue que
16 la incorporación al diluyente Tris base de SDS posestabilización producirá una mayor acción
17 protectora sobre EE y espermatozoides seminales durante el proceso de congelación-
18 descongelación.

19

20 **MATERIALES Y MÉTODOS**

21 Con el fin de cumplir con el objetivo planteado se diseñaron dos experimentos.

22 **Experimento 5**

23 Se utilizaron felinos (n=15) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un
24 peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual, utilizando un diseño aleatorio (Petersen, 1985). Los

1 felinos utilizados fueron incluidos en un plan de control urbano de la reproducción. Luego de
2 la orquiectomía bilateral, los testículos y EPI de cada animal se colocaron inmediatamente en
3 SF con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, mantenidos a temperatura ambiente y
4 enviados rápidamente al laboratorio (Slatter, 1993).

5 Los EPI fueron procesados dentro de las 4 hs posteriores a la orquiectomía, tiempo
6 que se tarda desde la orquiectomía hasta la llegada de los órganos al laboratorio. Se separaron
7 las colas de los epidídimos y se atemperaron en un baño termostatzado a 37°C por 10
8 minutos en 0,75 ml de Tris base (Tris 3,025g, ácido cítrico 1,27 g, fructosa 1,25 g, agua
9 destilada csp 100 ml). La recuperación de los EE se realizó por cutting de la cola del
10 epidídimo (Tittarelli y col., 2006).

11 Pruebas de contrastación del material seminal *in vitro*:

12 Los EE obtenidos en Tris base fueron colocados en un baño termostatzado a 37°C y
13 sometidos a las mismas pruebas de contrastación descriptas en el experimento 1.

14 Para realizar la congelación de los EE se utilizaron dos diluyentes (n=2) diferentes.
15 Los EE recuperados se mezclaron con un volumen calculado de cada uno de los diluyentes
16 descriptos para obtener una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml. Se utilizó un
17 diluyente TRIS sin el agregado SDS (TRIS) o con el agregado de 0,25% de SDS (SDS). La
18 dilución de los espermatozoides se realizó en dos pasos. El diluyente TRIS1 que se utilizó
19 tenía la siguiente composición: Tris (2,4 g), ácido cítrico (1,4 g), fructosa (0,6 g), glicerol (3
20 g), yema de huevo (20% v/v), penicilina sódica (0,06 g), sulfato de estreptomicina (0,1 g) y
21 agua destilada (csp 100ml; Axner y col., 2004). El diluyente TRIS2A que se utilizó tenía la
22 misma composición que el TRIS1, excepto que contenía 7% de glicerol (7g) y 0,5% de SDS.
23 El diluyente TRIS2B fue igual al 2A excepto que no contenía SDS. La primera dilución se
24 realizó pos obtención de los EE. Luego de un tiempo de equilibración de 1 hora a 4°C, previo

1 al empaquetado se realizó la segunda dilución. Luego de la segunda dilución los EE fueron
2 envasados en pajuelas de 0,25 ml y congelados de acuerdo a la técnica descripta por Axner
3 (Axner y col., 2004). La descongelación de los EE se realizó a 37 °C durante 1 minuto
4 (Stornelli MA, 2004).

5 Los EE congelados-descongelados fueron sometidos a las mismas pruebas de
6 contrastación microscópica que los EE frescos.

7

8 **Experimento 6**

9 Se utilizaron felinos (n=4) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un
10 peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual, utilizando un diseño aleatorio (Petersen, 1985). Los
11 felinos fueron alojados en una habitación acondicionada, en jaulas individuales, alimentados
12 con alimento balanceado (Fit 32[®], Royal Canin, Argentina) y agua *ad-libitum*. Los ANI se
13 encontraban sometidos a un régimen de luz artificial incandescente con luces de 100 W a
14 aproximadamente 50 cm de los felinos. Para mantener la producción espermática durante el
15 estudio se alternaron CFL con CFC (Nuñez y col., 2012). Los felinos fueron anestesiados con
16 ketamina (25 mg/kg i.m; Ketamina 50[®], Holliday-Scott SA, Argentina, xylazina (1mg/kg i.m;
17 Kensol[®] Köning SA, Argentina) y atropina (0.04 mg/kg i.m.; Slatter, 1993) y sometidos cada
18 15 días a electroeyaculación (Stornelli MA y col., 2007a; Nuñez y col., 2012). La
19 electroeyaculación fue realizada mediante la técnica descripta en el experimento 1 del
20 capítulo II. Se obtuvieron un total de 12 eyaculados, 3 por cada ANI.

21 El semen obtenido fue congelado con los diluyentes y la metodología descripta en el
22 experimento 5. Se utilizó la misma metodología de descongelación. El semen fresco y
23 congelado-descongelado fue sometido a las mismas pruebas de contrastación descriptas en el
24 experimento 1 del capítulo II.

1 **Análisis estadístico**

2 Los datos fueron analizados mediante ANOVA con PROC GLM de SAS[®] (SAS,
3 2003).

4

5 **Marco bioético del uso de animales**

6 Los experimentos se realizaron respetando las mismas consideraciones especificadas
7 en el experimento 1 del capítulo II.

8

9

RESULTADOS

10 En el experimento 5, el porcentaje de MI, IM e AI en los EE frescos fue superior al de
11 los EE congelados-descongelados ($62,5 \pm 6,39$ vs $12,5 \pm 0,91$; $67,5 \pm 0,54$ vs $15,5 \pm 4,2$; $47,5 \pm 3,83$
12 vs $23,5 \pm 6,75$; $P < 0.001$; Figura 4.1. A, C, y D). El porcentaje de MI en los EE congelados con
13 SDS fue superior a los EE congelados con TRIS (21 ± 2.32 vs 10 ± 1.63 ; $P < 0.001$; Figura 4.2.
14 A). El porcentaje de VI, IM y AI fueron similares entre los EE congelados-descongelados con
15 TRIS o con SDS (Figura 4.2. B-D).

16 En el experimento 6, el porcentaje de MI, VI, IM y AI fue superior en el semen fresco
17 al del semen congelado-descongelado ($91,25 \pm 2,72$ vs $21,85 \pm 2,71$; $5 \pm 0,05$ vs $3,27 \pm 0,05$;
18 $81,08 \pm 2,95$ vs $13 \pm 2,95$; $73 \pm 3,59$ vs $23,50 \pm 3,59$; $P < 0.001$; Figura 4.3. A-D). El porcentaje de
19 MI en el semen congelado con SDS fue superior al del semen congelado con TRIS
20 ($29.12 \pm 3,68$ vs $14,58 \pm 3.68$; Figura 4.4. A). el porcentaje de VI, IM y AI fue similar entre el
21 semen congelado con TRIS o con SDS (Figura 4.4. B-D).

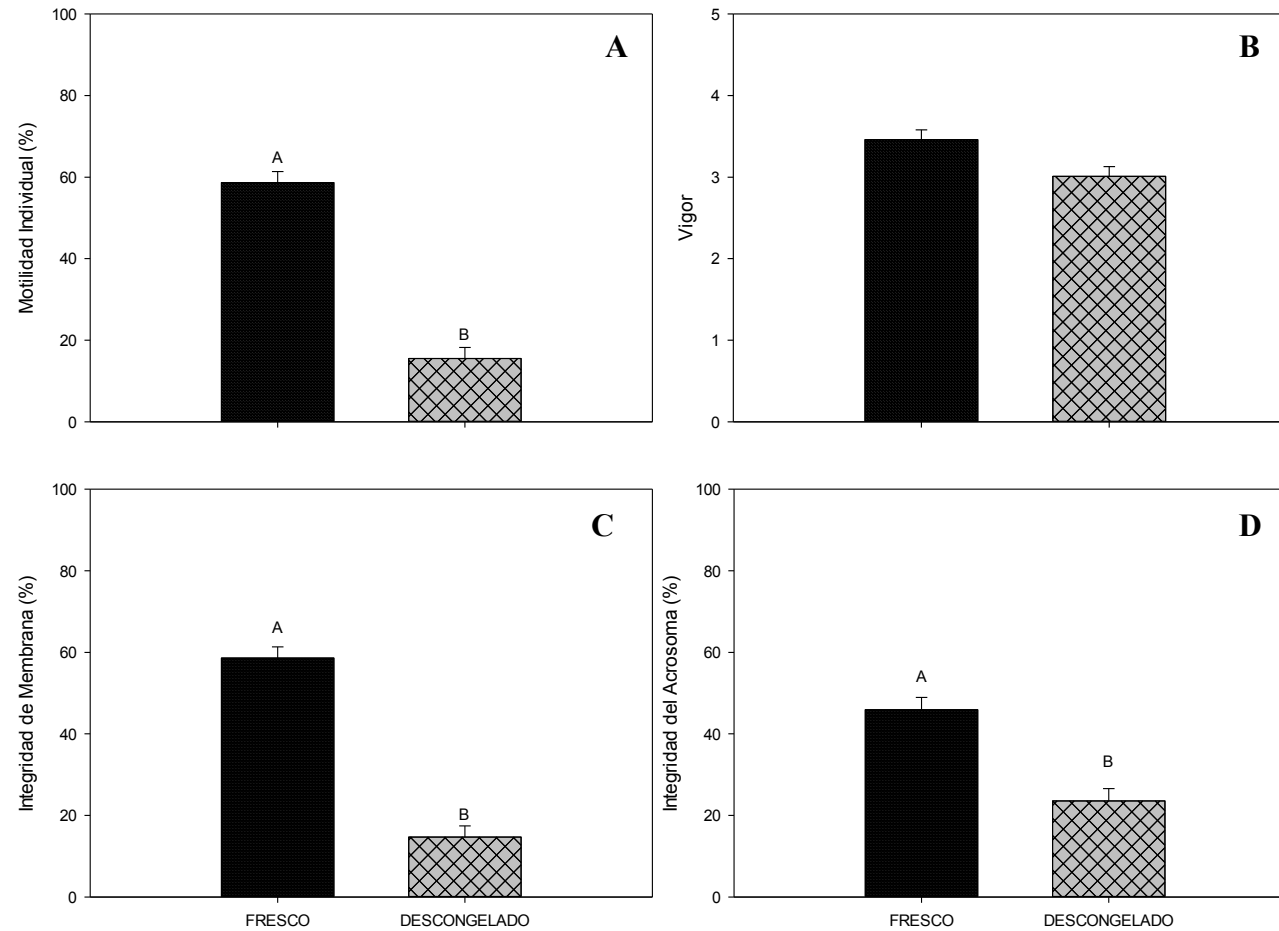


Figura 4.1. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados. Valores expresados en CMM \pm ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

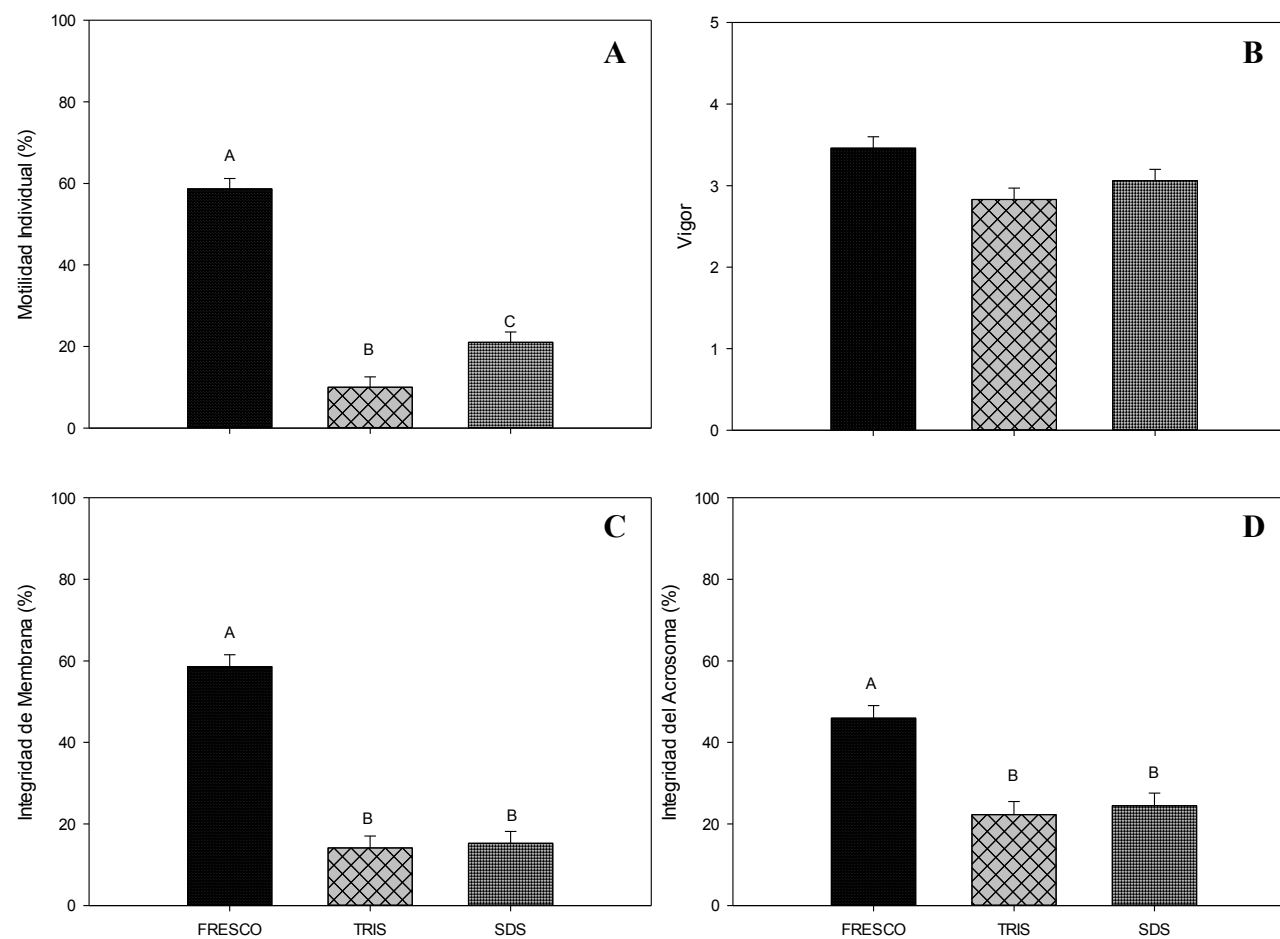


Figura 4.2. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados con TRIS y con SDS. Valores expresados en CMM \pm ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

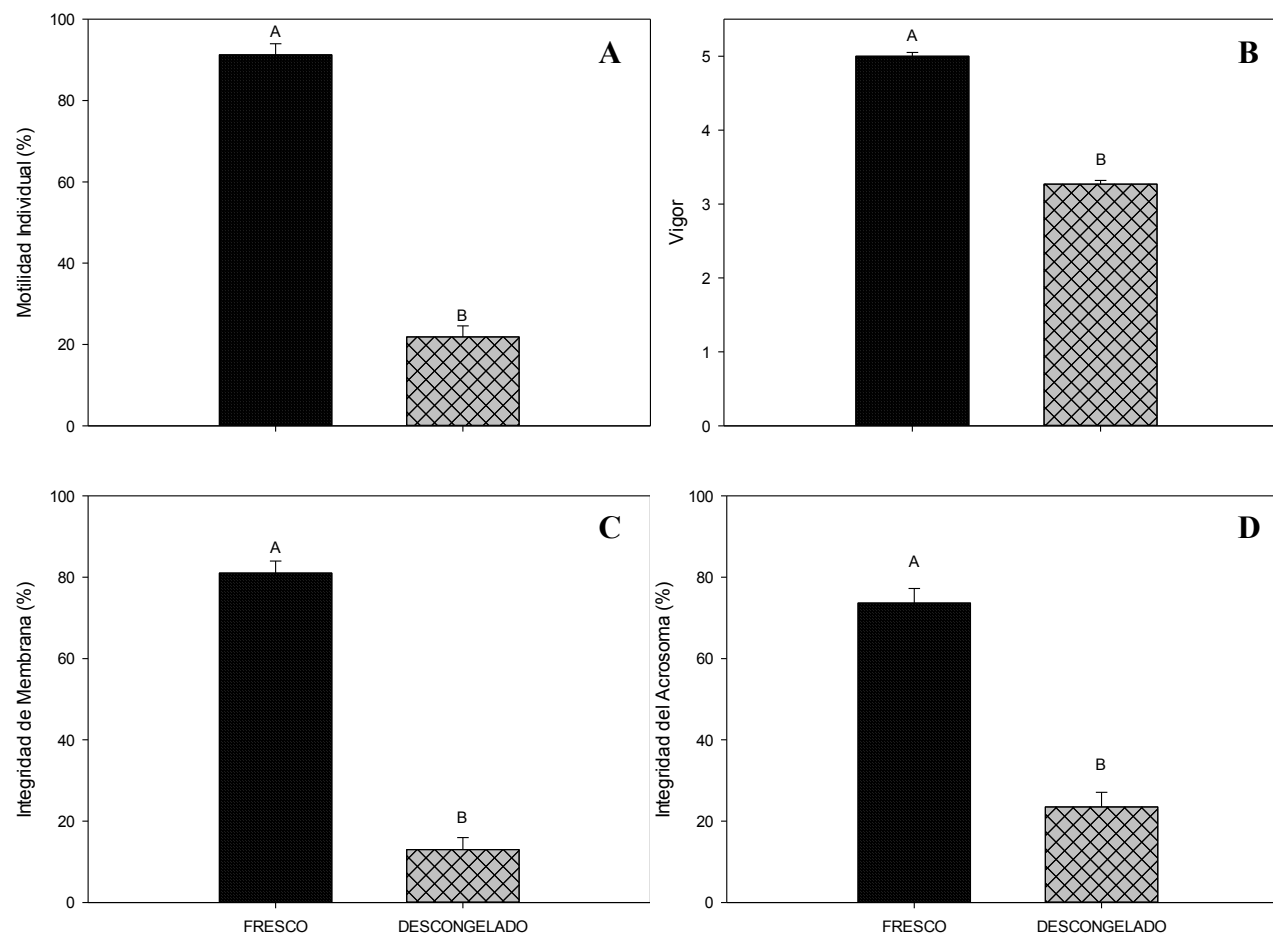


Figura 4.3. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre semen fresco y congelado-descongelado. Valores expresados en CMM±ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

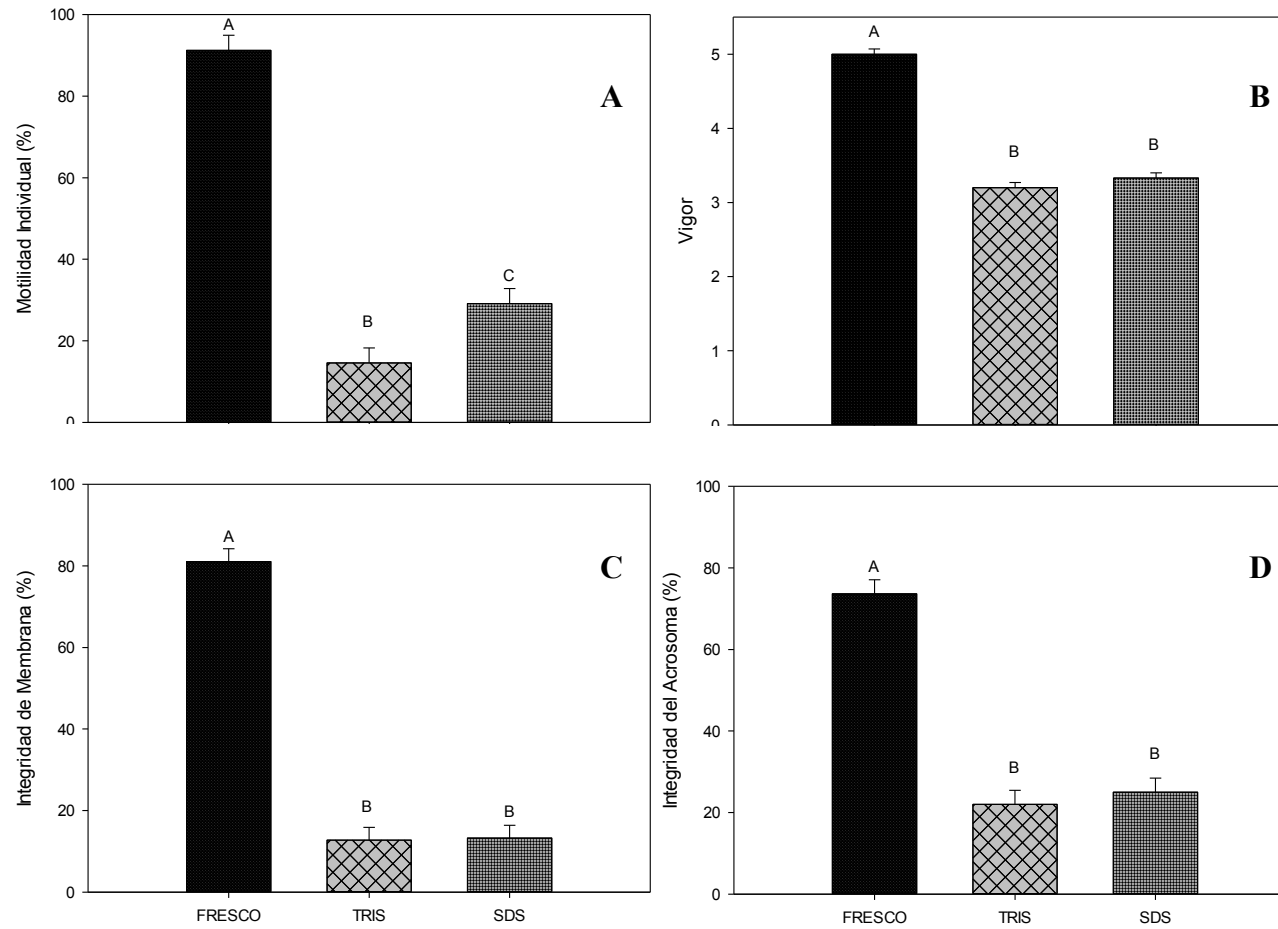


Figura 4.4. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre semen fresco y congelado-descongelado con TRIS y con SDS. Valores expresados en CMM±ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Siendo la membrana acrosomal del espermatozoide un componente fundamental y necesario durante la fertilización, considerada uno de los sitios principales donde ocurren las injurias durante la criopreservación, numerosos estudios se han enfocado en obtener un diluyente que porteja esta estructura (Watson, 1995; Maxwell y Watson, 1996, Prathalingam y col., 2006; Strom y col., 1997).

Nuestros resultados muestran un descenso significativo en todos los parámetros evaluados en los espermatozoides congelados-descongelados en comparación con los valores observados en fresco. El descenso observado en la MI fue superior al observado por otros autores en espermatozoides felinos criopreservados (Axner y col., 2004; Baran y col., 2004; Thuwanut y col., 2008; Mizutani y col., 2010; Chatdarong y col., 2009; Zambelli y col., 2010b; Vick y col., 2012; Jiménez Vaquero, 2013).

El descenso observado en la IM en nuestro trabajo, al igual que lo ocurrido con la MI, fue superior al de otros autores (Axner y col., 2004; Tebet y col., 2006; Thuwant y col., 2008; Thuwant y Chatdarong, 2009; Jiménez Vaquero, 2013; Villaverde y col., 2013). Las diferencias observadas podrían atribuirse a los factores discutidos en el experimento 1.

Diferentes trabajos estudiaron el efecto protector del OEP, STM Paste o su principal componente SDS. Se ha visto previamente que la adición de Equex a un diluyente de congelación mejora la supervivencia y reduce el daño espermático al descongelado en varias especies (Arriola y Foote, 1987; Rota y col., 1997; Nakatsukasa y col., 2001; Mizutani y col., 2010; Zambelli y col., 2010b).

En concordancia con lo observado en trabajos en felinos y en otras especies, nuestros resultados mostraron un efecto positivo sobre la MI en el diluyente que contiene SDS cuando lo comparamos con aquel diluyente que no lo posee (Axner y col., 2004; Mizutani y col.,

1 2010; Pursel y col., 1978; Aboagla y Terada, 2004a b; Tsuitsui y col., 2000). En nuestro
2 trabajo a diferencia de lo observado por Zambelli y col., no se detectó un efecto protector
3 sobre el acrosoma. Las mencionadas diferencias podrían explicarse a la mayor concentración
4 de detergente y la técnica distinta para evaluar la integridad del acrosoma utilizada por Zambelli
5 (Zambelli y col., 2010b).

6 Axner y col., demostraron que con 0,5% de Equex se protegieron los acrosomas
7 durante la congelación en felinos, pero observaron un efecto negativo sobre la motilidad y
8 longevidad disminuyendo sus niveles durante la incubación (Axner y col., 2004). En
9 contraposición con lo observado por Axner y col., en nuestro trabajo no se registró un efecto
10 protector sobre los acrosomas pero si sobre la MI.

11 Mizutani comparó el efecto de 1% de OEP o 3mg/ml de SDS en el diluyente de
12 congelación de espermatozoides felinos, obteniendo efectos positivos con ambos
13 componentes al congelar espermatozoides felinos, sin embargo el OEP fue superior (Mizutani
14 y col., 2010). En este trabajo el GLY se adicionó en un segundo paso de dilución, a diferencia
15 de nuestro experimento en el cual el GLY se incorporó en dos etapas. En contraposición con
16 los resultados de Axner y col., Mizutani y col., no observaron un efecto negativo del OEP o
17 SDS durante la incubación, lo que podría deberse a las diferentes temperaturas usadas en
18 dicho momento (38°C vs 20°C). Las diferencias observadas entre los mencionados trabajos,
19 podrían deberse también a la diferente capacidad para resistir el proceso de criopreservación
20 que poseen los espermatozoides según el origen (eyaculado o epididimal; Axner y col., 2004;
21 Mizutani y col., 2010). Sin embargo, nosotros no observamos diferencias entre los
22 espermatozoides según el origen, en concordancia con expresado por Tebet y col. (Tebet y
23 col., 2006). En nuestro trabajo no se realizó el estudio de la termoresistencia, los parámetros
24 fueron evaluados inmediatamente al descongelado.

1 Buenos resultados fueron obtenidos en porcinos cuando se agregó Equex al diluyente
2 de congelación (Pursel y col., 1978). Pursel y col., observaron un aumento en la motilidad con
3 0,5 y 1% de OEP agregados al diluyente de congelación en porcinos, mientras que con 1 y
4 1,5% se pudo detectar una mayor conservación de la integridad acrosómica por contraste de
5 fase (Pursel y col., 1978). Por otro lado, Graham y Crabo comunicaron que 0,25% es la
6 concentración óptima para mejorar la motilidad al descongelado en porcinos, lo cual
7 concuerda con nuestro trabajo (Graham y Crabo, 1972). En la alpaca con el agregado de 1%
8 de Equex se observó una mejor motilidad e AI (Morton y col., 2010). Sin embargo, en
9 nuestros resultados no se observó un efecto benéfico del SDS en AI. Este hecho podría
10 deberse a que en porcinos y alpacas se usaron concentraciones mayores de detergente y
11 menores de GLY en el diluyente de congelación (Morton y col., 2010; Pursel y col., 1978).

12 Similar a lo observado en porcinos, en caninos el agregado Equex al diluyente de
13 congelación permitió obtener mejores resultados que sin el Equex. Rota y col., agregaron
14 0,5% y observaron un incremento en la motilidad que se mantuvo en el tiempo (Rota y col.,
15 1997; Rota y col., 1999). Tsuitsui y col., agregaron 1% y observaron que el detergente ejerció
16 protección sobre los acrosomas, mejoró la motilidad, redujo los efectos de la peroxidación de
17 la membrana espermática y prolongó la supervivencia al descongelado (Tsuitsui y col., 2000a,
18 b). Sin embargo, el semen canino congelado con 2,5% de Equex reveló una mayor cantidad
19 de células con cambios similares a la capacitación que aquellas que fueron criopreservadas
20 con menores cantidades de detergente (Stornelli MA, 2004). En el trabajo realizado por
21 Ponglowhapan y Chatdarong, en contraposición con nuestros resultados, el agregado de
22 Equex al diluyente de congelación de EE en caninos, no reveló una mejor motilidad
23 inmediatamente al descongelado, sin embargo mejoró el porcentaje de AI (Ponglowhapan y
24 Chatdarong, 2008). En dicho trabajo proponen al origen de los espermatozoides y la

1 diferencia en las membranas, como una posible causa de la distinta respuesta al Equex, por lo
2 que no mejoraría la motilidad e IM inmediatamente al descongelado como sucede con los
3 espermatozoides eyaculados en la misma especie (Ponglowhapan y Chatdarong, 2008).

4 El Equex protege de manera diferente según la especie lo cual puede ser debido a las
5 diferencias de la membrana acrosomal (Cheng y col., 2004). En algunos trabajos se manifestó
6 el efectos tóxico del Equex al estar en contacto por un tiempo prolongado con los
7 espermatozoides. Una de las maneras de evitar estos efectos indeseados, es la incorporación
8 del Equex previo al congelado y no durante el equilibrado o estabilizado de la muestra. Por
9 otro lado, se ha expuesto que luego de la IA los espermatozoides abandonarían el diluyente de
10 congelación, y de esta manera el Equex no tendría el efecto tóxico sobre los espermatozoides
11 que se observó durante la incubación a 38°C *in vitro* (Axner y col., 2004). Es así que
12 finalmente se vería reflejado el efecto benéfico del detergente haciéndolo un componente
13 sumamente valioso para conservar intacto el acrosoma.

14 Nuestros resultados muestran que un diluyente Tris base que posea en su composición
15 el agregado de 0,25 % de SDS ejerce un efecto protector mayor que sobre los EF congelados-
16 descongelados que un diluyente Tris base sin el agregado de SDS. Futuros estudios permitirán
17 evaluar si cantidades mayores o menores de SDS permiten evidenciar un mayor efecto
18 protector sobre la célula espermática.

CAPITULO V

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE TREALOSA Y DODECIL SULFATO DE SODIO A UN DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA POST DESCONGELACIÓN EN FELINOS

INTRODUCCIÓN

El proceso de criopreservación espermática produce una pérdida de aproximadamente el 50% de la población celular. Un protocolo de congelación que se adecue a las particularidades de la célula espermática según la especie aumenta la probabilidad de supervivencia celular al descongelado (Cárdenas, 2013). Se han estudiado diferentes diluyentes de congelación para criopreservar EF. Debido a las graves consecuencias que sufre la membrana durante la transición de fase, en la cual incluso la célula puede perder parte de su contenido en el medio que la rodea, es esencial emplear un mecanismo para mantener su integridad (Crowe y col., 1987). Una de los protectores del shock de frío que más comúnmente se usa es la yema de huevo (Watson, 1981; Drobnis y col., 1993). Los detergentes gracias a su acción sobre las lipoproteínas de la yema de huevo, ejercen un efecto benéfico que se refleja en un incremento de la motilidad espermática e integridad acrosómica en los procesos de congelación-descongelación (Pursel y col., 1978). La adición al DIL de compuestos que contienen SDS (Equex STM paste u OEP) en diferentes cantidades, ha mostrado ejercer efectos benéficos en porcinos, bovinos, equinos, caninos y ratón. Los diluyentes que contenían el mencionado compuesto permitieron obtener mayores porcentajes de motilidad e integridad acrosómica y mejor fertilidad *in vivo* e *in vitro* que los diluyentes sin detergente (Penfold y Moore, 1993; Martin y col., 1979; Rota y col., 1997; Rota y col., 1999;

1 Peña y Linde-Forsberg, 2000; Peña y col., 2003; Stornelli MA, 2004; Pursel y col., 1978;
2 Arriola y Foote, 1987). Compuestos que contienen SDS sólo o como un componente del
3 Equex STM paste han sido incluidos en diluyentes usados para la congelación de
4 espermatozoides epididimales felinos observándose un efecto protector del SDS sobre el
5 acrosoma (Axner y col., 2004).

6 Otros crioprotectores como la TREA, brindan un medio hipertónico causando
7 deshidratación celular antes de la congelación (Crowe y col., 1989; Crowe y col. 2001). Este
8 efecto osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cuantía de
9 daño celular relacionada con la formación intracelular de cristales de hielo (Aisen y col.,
10 2002). La TREA posee además una acción protectora relacionada con su interacción
11 específica con los fosfolípidos de membrana durante la desecación y congelación y puede ser
12 capaz de prevenir la separación de fase y la fusión entre las bicapas durante la congelación
13 (Crowe y col., 1989; Crowe y col., 2001; Bakas y Disalvo, 1991; Chen y col., 2000). La
14 TREA ha sido utilizada con éxito en al criopreservar semen en algunas especies (Aisen y col.,
15 2000; Molinia y col., 1994). Sin embargo, existen autores que señalan que los crioprotectores
16 no penetrantes no son capaces de proteger por sí solos, sino que aumentan la efectividad de
17 los penetrantes (Holt, 2000). Se ha comprobado en conejos que la combinación de un
18 crioprotector permeable y uno no permeable fue más efectiva en la conservación espermática
19 (Dalimata y Graham, 1997).

20 Aboagla y Terada, observaron que un diluyente con alta concentración de TREA
21 puede afectar la solubilidad de la yema de huevo, pero esta se solubiliza en presencia de SDS
22 (Dewit y col., 2000; Aboagla y Terada, 2004a b). De esta manera si se combinara la acción de
23 un detergente, que actué mejorando la protección al shock de frío de las lipoproteínas de baja
24 densidad de la yema de huevo, con un crioprotector se podría obtener un diluyente con mayor

1 efecto protector, que se podría reflejar con un aumento de la viabilidad espermática al
2 descongelado. En ovinos, se observó que la combinación de TREA con lipoproteínas de baja
3 densidad sin GLY mejora la calidad espermática al descongelado (Tonieto y col., 2010). La
4 combinación TREA y SDS mejoró la congelabilidad espermática en caprinos (Aboagla y
5 Terada, 2004 a b). Aboagla y Terada, observaron que al adicionar SDS al diluyente base que
6 contenía 0,370mM de TREA aumentaba la AI al descongelado (Aboagla y Terada, 2004a b).
7 En los mencionados trabajos los autores comunicaron que al agregar SDS al diluyente
8 mejoraba la motilidad. Sin embargo, al aumentar la cantidad de detergente incorporado al
9 diluyente la misma disminuía. Este mismo efecto pudo observarse en caninos en los cuales
10 cantidades del 2% de SDS producían mayores alteraciones ultramicroscópicas al
11 descongelado que 1,5% (Stornelli MA, 2004). En concordancia con lo observado por Aboagla
12 y Terada en caprinos, Mansilla y col., observaron en caninos que un diluyente que contenía
13 TREA y SDS mejoró los parámetros seminales comparado con un diluyente Tris base sin el
14 agregado de estos compuestos, manifestándose el efecto protector de ambos componentes
15 (Mansilla y col., 2011). En porcinos se evaluó el efecto de la incorporación de TREA a un
16 diluyente que contenía Orvus ES Paste, observándose una acción benéfica con aumento de la
17 fluidez de la membrana espermática al descongelado (Gómez-Fernández y col., 2012).

18 Jiménez, comparó la congelación de EE en el felino doméstico usando distintos
19 diluyentes comerciales (Triladil[®], AndroMed[®], Gent[®]), los cuales son utilizados para la
20 congelación de semen en otras especies y los comparó con el diluyente Tris base que se usa
21 comúnmente para criopreservar los EF (Jiménez y col., 2013). Sin embargo no hay trabajos
22 que combinen la acción de un disacárido como la TREA y un detergente como el SDS
23 incorporados al diluyente de congelación para criopreservar EF. Sumar la acción protectora de
24 ambos componentes (TREA+SDS), permitiría proveer a los espermatozoides de un diluyente

1 con mayores condiciones para proteger a la célula de las injurias durante el proceso de
2 criopreservación.

3 El profundo y sistemático estudio de distintos componentes que permitan realizar una
4 mejor criopreservación espermática permitirá obtener un diluyente que reúna las condiciones
5 que requiere el espermatozoide felino para soportar el proceso de congelación-descongelación
6 y fertilizar ovocitos de manera exitosa.

7 El objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de la adición de TREA y
8 SDS al diluyente Tris sobre la supervivencia espermática al descongelado en felinos. La
9 hipótesis fue que la incorporación al diluyente Tris de TREA y SDS que ejercen diferente
10 acción crioprotectora permitirá obtener un diluyente en el cual se potencie la acción protectora
11 de estas sustancias sobre los EE y espermatozoides seminales durante el proceso de
12 congelación-descongelación.

13

14 **MATERIALES Y MÉTODOS**

15 Con el fin de cumplir con el objetivo planteado se diseñaron dos experimentos.

16 **Experimento 7**

17 Se utilizaron felinos (n=18) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un
18 peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual, utilizando un diseño aleatorio (Petersen, 1985). Los
19 felinos utilizados fueron incluidos en un plan de control urbano de la reproducción. Luego de
20 la orquitectomía bilateral, los testículos y EPI de cada ANI se colocaron inmediatamente en
21 solución fisiológica (SF) con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, mantenidos a
22 temperatura ambiente y enviados rápidamente al laboratorio (Slatter, 1993).

23 Los EPI fueron procesados dentro de las 4 hs posteriores a la orquitectomía, tiempo
24 que se tarda desde la orquitectomía hasta la llegada de los órganos al laboratorio. Se separaron

1 las colas de los epidídimos y se atemperaron en un baño termostatzado a 37°C por 10
2 minutos en 0,75 ml de Tris base (Tris 3,025g, ácido cítrico 1,27 g, fructosa 1,25 g, agua
3 destilada csp 100 ml). La recuperación de los EE se realizó por cutting de la cola del EPI
4 (Tittarelli y col., 2006).

5 Pruebas de contrastación del material seminal *in vitro*:

6 Los EE obtenidos en Tris base fueron colocados en un baño termostatzado a 37°C y
7 sometidos a las mismas pruebas de contrastación descriptas en el experimento 1.

8 Para realizar la congelación de los EE se utilizaron dos diluyentes (n=2) diferentes.
9 Los EE recuperados se mezclaron con un volumen calculado de cada uno de los diluyentes
10 descriptos para obtener una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml. Se utilizó un
11 diluyente TRIS sin el agregado TREA+SDS (TRIS) o con el agregado de 0,312% (3.3
12 mOsm/L) de TREA y 0,25% de SDS (SDS). La dilución de los espermatozoides se realizó en
13 dos pasos. El diluyente TRIS1 que se utilizó tenía la siguiente composición: Tris (2,4 g),
14 ácido cítrico (1,4 g), fructosa (0,6 g), glicerol (3 g), yema de huevo (20% v/v), penicilina
15 sódica (0,06 g), sulfato de estreptomicina (0,1 g) y agua destilada (csp 100ml; Axner y col.,
16 2004). El diluyente TRIS2A que se utilizó tenía la misma composición que el TRIS1, excepto
17 que contenía 7% de glicerol (7g) y 0,5% de SDS. El diluyente TRIS2B fue igual al 2A
18 excepto que no contenía SDS. La primera dilución se realizó pos obtención de los EE. Luego
19 de un tiempo de equilibración de 1 hora a 4°C, previo al empaquetado se realizó la segunda
20 dilución. Luego de la segunda dilución los EE fueron envasados en pajuelas de 0,25 ml y
21 congelados de acuerdo a la técnica descripta por Axner (Axner y col., 2004). La
22 descongelación de los EE se realizó a 37 °C durante 1 minuto (Stornelli MA, 2004).

23 Los EE congelados-descongelados fueron sometidos a las mismas pruebas de
24 contrastación microscópica que los EE frescos.

1 Experimento 8

2 Se utilizaron felinos (n=4) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un
3 peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual, utilizando un diseño aleatorio (Petersen, 1985). Los
4 felinos fueron alojados en una habitación acondicionada, en jaulas individuales, alimentados
5 con alimento balanceado (Fit 32[®], Royal Canin, Argentina) y agua *ad-libitum*. Los ANI se
6 encontraban sometidos a un régimen de luz artificial incandescente con luces de 100 W a
7 aproximadamente 50 cm de los felinos. Para mantener la producción espermática durante el
8 estudio se alternaron CFL con CFC (Nuñez y col., 2012). Los felinos fueron anestesiados con
9 ketamina (25 mg/kg i.m; Ketamina 50[®], Holliday-Scott SA, Argentina, xylazina (1mg/kg i.m;
10 Kensol[®] Köning SA, Argentina) y atropina (0.04 mg/kg i.m; Atropina[®] Jhon Martin SA,
11 Argentina; Slatter, 1993) y sometidos cada 15 días a electroeyaculación (Stornelli MA y col.,
12 2007a; Nuñez y col., 2012). La electroeyaculación fue realizada mediante la técnica descripta
13 en el experimento 1 del capítulo II. Se obtuvieron un total de 12 eyaculados, 3 por cada ANI.

14 El semen obtenido fue congelado con los diluyentes y la metodología descripta en el
15 experimento 7. Se utilizó la misma metodología de descongelación. El semen fresco y
16 congelado-descongelado fue sometido a las mismas pruebas de contrastación descriptas en el
17 experimento 1 del capítulo II.

18

19 Análisis estadístico

20 Los datos fueron analizados mediante ANOVA con PROC GLM de SAS[®] (SAS,
21 2003).

22

1 **Marco bioético del uso de animales**

2 Los experimentos se realizaron respetando las mismas consideraciones bioéticas
3 especificadas en el experimento 1 del capítulo II.

4

5 **RESULTADOS**

6 En el experimento 7, el porcentaje de MI, IM e AI en los EE frescos fue superior al de
7 los EE congelados-descongelados ($55,55 \pm 2,47$ vs $15,02 \pm 2,47$; $3,75 \pm 0,13$ vs $3,13 \pm 0,13$;
8 $52,50 \pm 2,31$ vs $20,33 \pm 2,31$; $57,16 \pm 2,22$ vs $40,11 \pm 2,22$; $P < 0.001$; Figura 5.1. A, C, D). El
9 porcentaje de MI y VI en los EE congelados con TREA+SDS fue superior a los congelados
10 con TRIS ($20,69 \pm 2,48$ vs $10,97 \pm 2,48$; $3,5 \pm 0,19$ vs $2,69 \pm 0,19$; $p < 0.001$; Figura 5.2. A, B). El
11 porcentaje de IM y AI fueron similares entre los EE congelados-descongelados con TRIS o
12 con TREA+SDS (Figura 5.2. C, D).

13 En el experimento 8, el porcentaje de MI, VI, IM e AI en el semen fresco fue superior
14 al del semen congelado-descongelado ($89,37 \pm 2,98$ vs $12,5 \pm 2,98$; $4,87 \pm 0,32$ vs $2,81 \pm 0,32$;
15 $73,25 \pm 4,62$ vs $15,25 \pm 4,62$; $73,25 \pm 5,18$ vs $36,12 \pm 5,18$; $P < 0.001$; Figura 5.3 A-D). El
16 porcentaje de MI y VI en el semen congelado con TREA+SDSD fue superior al congelado
17 con TRIS ($18,75 \pm 4,18$ vs $6,25 \pm 4,18$; $3,37 \pm 0,44$ vs $2,25 \pm 0,44$ $P < 0.01$; Figura 5.4. A, B). El
18 porcentaje de IM y AI fueron similares entre el semen congelado-descongelado con TRIS o
19 con TREA+SDS (Figura 5.4. C, D).

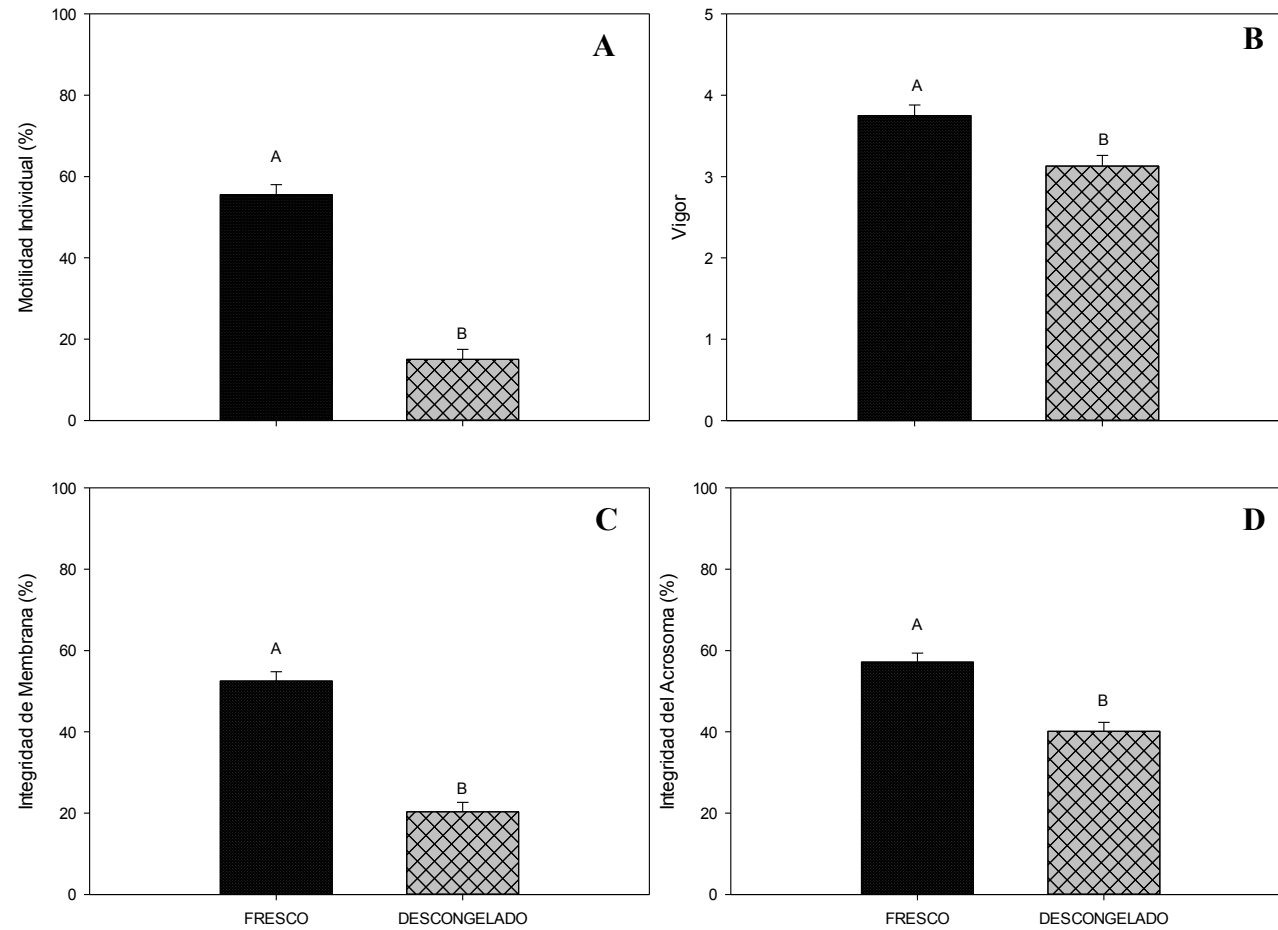


Figura 5.1. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados. Valores expresados en CMM±ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

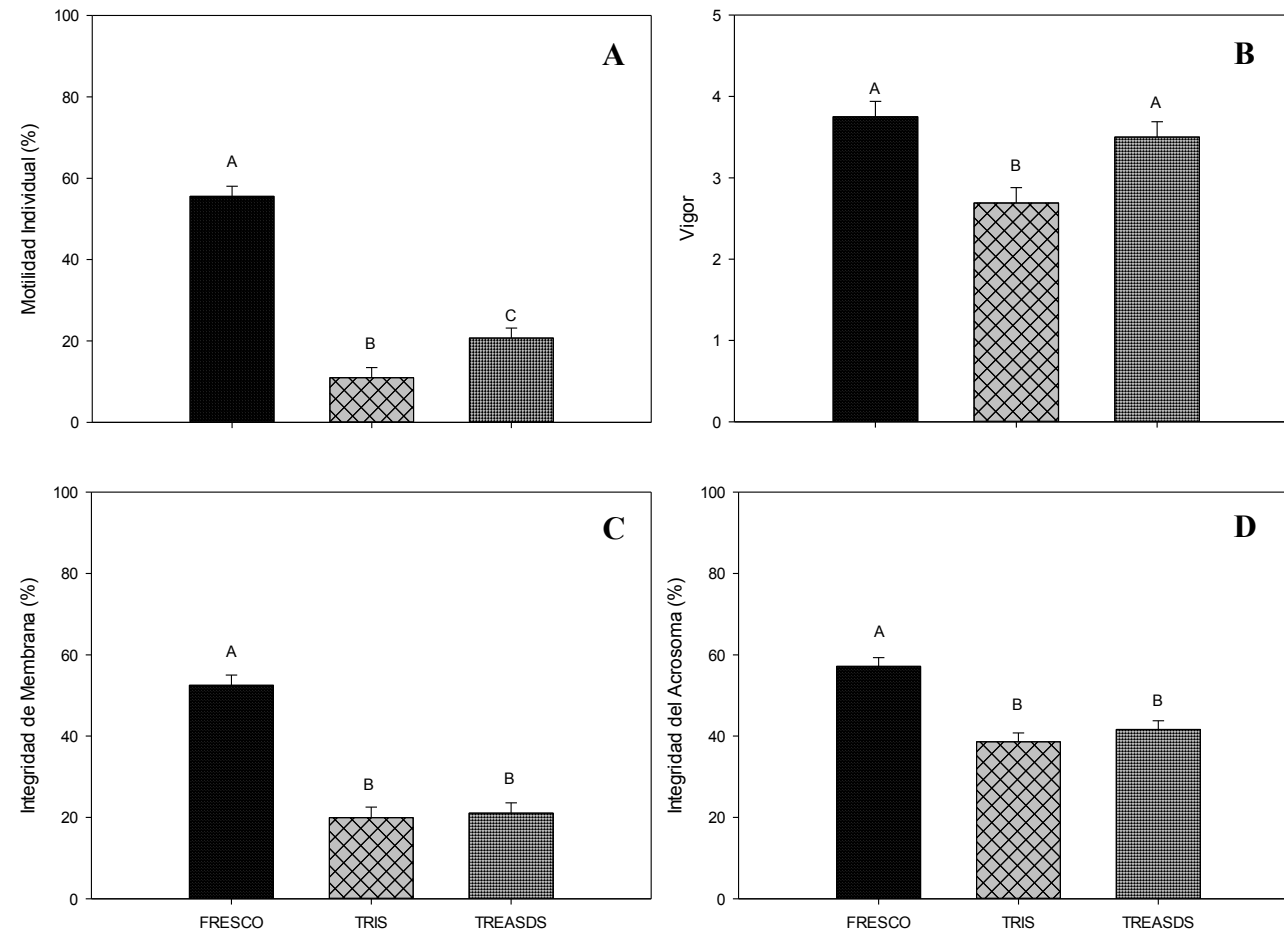


Figura 5.2. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados con TRIS y con TREA+SDS. Valores expresados en CMM±ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

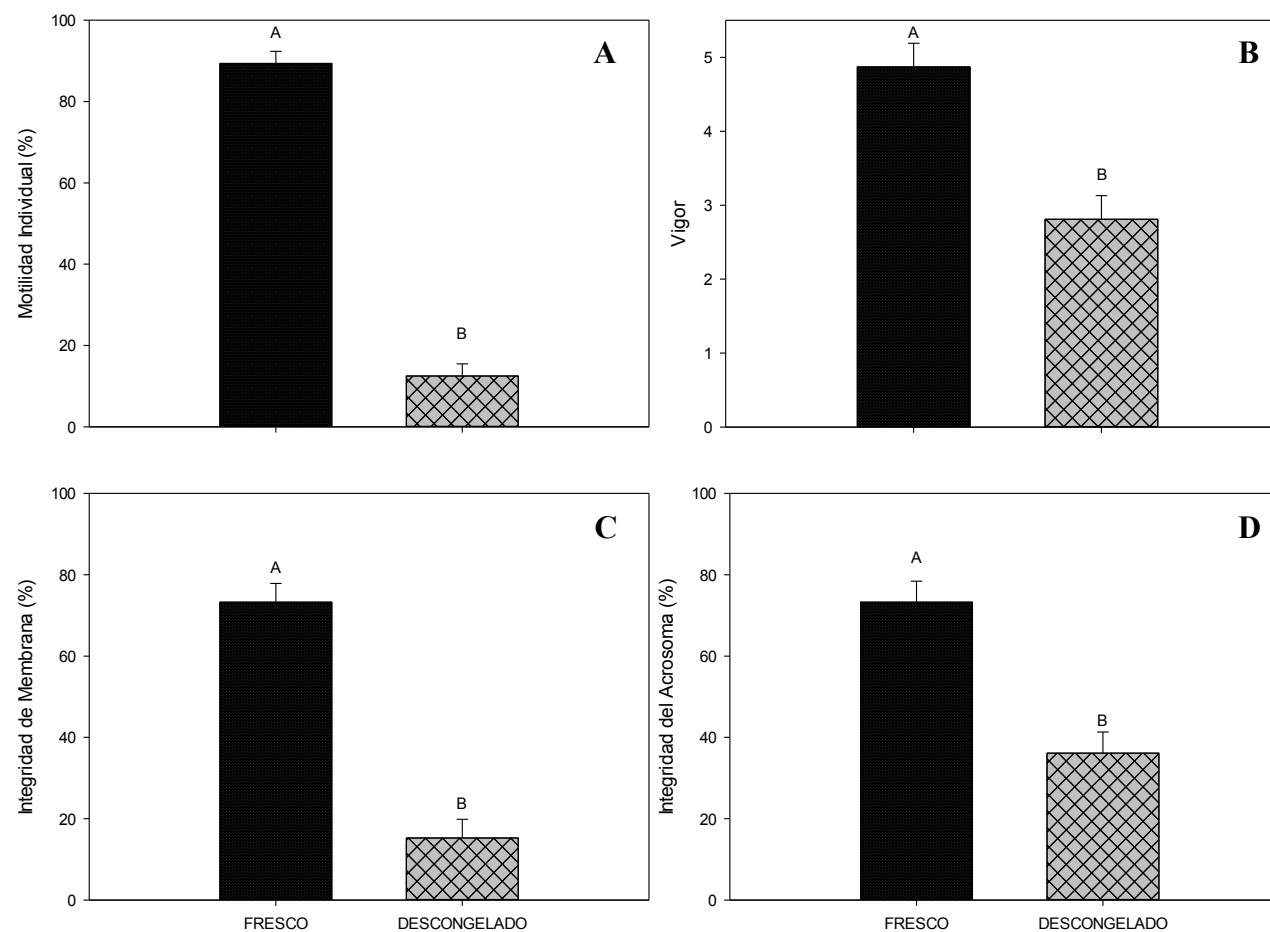


Figura 5.3. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre semen fresco y congelado-descongelado. Valores expresados en CMM±ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

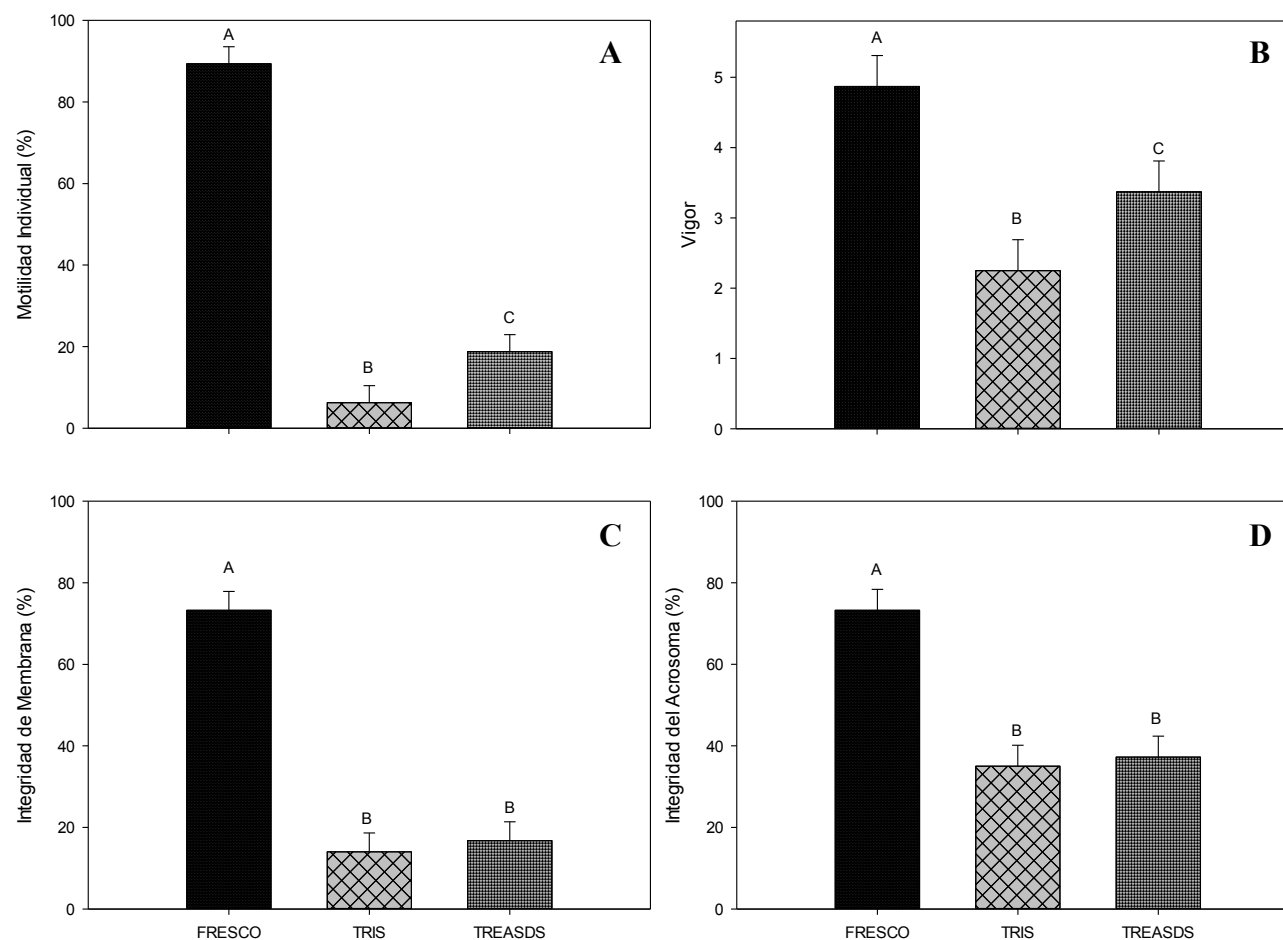


Figura 5.4. Variaciones en el porcentaje de motilidad individual (A), vigor (B), porcentaje de membranas íntegras (C), y porcentaje de acrosomas intactos (D) entre semen fresco y congelado-descongelado con TRIS y con TREA+SDS. Valores expresados en CMM±ES. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,001$).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La supervivencia espermática luego del procedimiento de criopreservación depende de varios factores entre ellos de la técnica de congelación, la composición del diluyente, el/los crioprotector/es utilizado/s, pasos de dilución realizados, tasa de enfriado y método de descongelación elegido (Aboagla y Terada, 2004b).

Nuestros resultados muestran un descenso significativo en todos los parámetros evaluados en los espermatozoides congelados-descongelados en comparación con los valores observados en fresco. El descenso observado en la MI fue superior al observado por otros autores en EF criopreservados (Axner y col., 2004; Baran y col., 2002; Thuwanut y col., 2008; Mizutani y col., 2010; Chatdarong y col., 2009; Zambelli y col., 2010; Vick y col., 2012; Jiménez Vaquero, 2013).

El descenso observado en la IM en nuestro trabajo al igual que lo ocurrido con la MI, fue superior al de otros autores (Axner y col., 2004; Tebet y col., 2006; Thuwant y col., 2008; Thuwant y Chatdarong, 2009; Jiménez Vaquero, 2013; Villaverde y col., 2013). Las diferencias observadas podrían atribuirse a los factores discutidos en el experimento 1 de esta Tesis.

No se han realizado trabajos previos en felinos donde se combine un disacárido y un detergente en el diluyente de congelación. A partir de datos obtenidos en experimentos previos en esta tesis se decidió formular un diluyente que combinó un detergente (SDS) y un disacárido (TREA).

En concordancia con lo observado en trabajos en otras especies, nuestros resultados mostraron un efecto positivo sobre la MI y VI en el diluyente que contiene TREASDS cuando lo comparamos con el TRIS base sin los mencionados compuestos (Mansilla y col., 2011; Aboagla y Terada, 2004a, b; Gómez-Fernández y col., 2012). En ovinos se vió un

1 aumento de la motilidad con el agregado de 0,1% de SDS. El aumento en la concentración de
2 detergente por encima de este valor influyó negativamente en la motilidad (Aboagla y Terada,
3 2004a, b). En porcinos también se pudo observar un efecto protector sobre los
4 espermatozoides criopreservados al utilizar un diluyente con TREA y SDS, pero las
5 concentraciones de SDS fueron superiores a las utilizadas en nuestro estudio (Gómez-
6 Fernández y col., 2012).

7 En nuestros resultados se puede observar una tendencia del diluyente a proteger la
8 integridad de la membrana acrosómica. En el caprino, el efecto positivo del diluyente sobre la
9 AI, necesitó concentraciones de detergente superiores a las nuestras (0,5%-0,75%), es decir
10 que en esta especie el agregado de SDS a un diluyente con TREA-yema de huevo mejora
11 significativamente la congelabilidad del semen (Aboagla y Terada, 2004 a, b). Así mismo, la
12 congelación en caprinos se realizó en dos pasos, estando ausente el GLY en el primer paso del
13 protocolo (Aboagla y Terada, 2004 a, b). En los trabajos anteriormente mencionados puede
14 observarse el efecto benéfico del detergente sobre la supervivencia espermática al
15 descongelado. Sin embargo se observan diferencias en la composición del diluyente,
16 concentración del detergente, uso de otras sustancias y agregado de GLY, lo cual podría
17 relacionarse con la diferente composición del diluyente en relación a la especie estudiada.

18 En nuestro trabajo se observa que la utilización de un diluyente Tris base que posea en
19 su composición el agregado de 0,312% TREA y 0,25% de SDS tiene un efecto protector
20 mayor sobre los EF congelados-descongelados que un diluyente Tris base sin el agregado de
21 TREA+SDS. Futuros estudios que permitan realizar modificaciones en el diluyente y ajustes
22 en el protocolo de congelación-descongelación podrían mejorar los resultados obtenidos al
23 criopreservar EE y espermatozoides seminales en el felino domestico.

CAPITULO VI

ESTUDIOS ULTRAMICROSCÓPICOS DE LOS ESPERMATOZOIDES FELINOS CONGELADOS-DESCONGELADOS

INTRODUCCIÓN

La microscopía electrónica (ME) es una herramienta usada en humanos para detectar la presencia de malformaciones espermáticas y permite evaluar aquellas alteraciones que causan infertilidad en los mismos (Baccetti y col., 1995; Baccetti y col., 2002). Así mismo en animales, la ME ha sido utilizada como una herramienta para el estudio morfológico de la célula espermática (Holt y col., 1998; Alvarenga y col., 2000; Jones y Stewart, 1979). En caninos mediante el uso del microscopio electrónico de barrido (MEB) y el microscopio electrónico de transmisión (MET) se han identificado anormalidades espermáticas en el semen fresco y daños, ocurridos durante el proceso de congelación-descongelación, en el semen criopreservado (Holt y col., 1998; Stornelli MA y de la Sota, 2006; Stornelli MA y col., 2007c; Jurado y col., 2008).

Si bien las pruebas rutinarias de contrastación seminal brindan información acerca de la cantidad y calidad de los espermatozoides de una muestra, estas no ofrecen información completa sobre el potencial fertilizante del material seminal (Jurado y col., 2008; Dunphy y col., 1989). La motilidad y la morfología espermática, evaluadas mediante microscopía óptica, son indicadores groseros de la capacidad fertilizante de ese semen, un daño subcelular puede afectar la fertilidad sin modificar la motilidad espermática o la morfología espermática observable al MO (Blottner y col., 2001). De esta forma, células espermáticas morfológicamente normales al MO pueden presentar alteraciones estructurales detectables al

1 ME (Tasseron y col., 1977). Las pruebas con tinciones fluorescentes resultan excelentes para
2 evaluar la integridad de las membranas de los espermatozoides, pero aún así, el estudio
3 ultramicroscópico puede proveer información mucho más detallada sobre la estructura
4 subcelular (Barthelemy y col., 1990; Markova, 2004; Nishizono y col., 2004).

5 En el MET se pueden observar cortes ultrafinos (60-90 nm) de la célula espermática,
6 lo que permite evaluar las estructuras intracelulares que la componen y los cambios
7 ultraestructurales que se puedan producir en ella (Pedersen y Fawcett, 1976; Zamboni, 1987;
8 Zamboni, 1991; Dadoune, 1988). Los espermatozoides criopreservados sufren cambios a
9 nivel estructural, algunos de estos son similares a los producidos durante los procesos de
10 capacitación y reducen la longevidad espermática (Paulens, 1993). Es así que el estudio de la
11 ultraestructura espermática nos brinda información detallada sobre la integridad del
12 espermatozoide pudiendo ser una herramienta sumamente útil en la detección de alteraciones
13 estructurales que interfieren en el proceso de fecundación (Jurado y col., 2008).

14 Para establecer el grado de daño asociado al proceso de congelado-descongelado de
15 los espermatozoides, el examen morfológico estructural y ultraestructural es de vital
16 importancia, debido a que permite detectar defectos a nivel de cabeza, pieza media y cola
17 (Hammerstedt y col., 1990; Parks y Graham, 1992; Jurado y col., 2008). Un ejemplo de
18 características morfológicas no observadas al MO son ciertas malformaciones acrosomales,
19 que sólo pueden detectarse mediante ME (Long y col., 1996).

20 El MET es el método más certero al momento de detectar daños sub-microscópicos y
21 localización de daños luego de realizar algún tratamiento (Jurado y col., 2008; Ozkavukcu y
22 col., 2008; Plummer y Watson, 1988; Reichart y col., 2000). Se han observado diferentes
23 alteraciones mediante el MET y MEB en el semen congelado-descongelado en distintas
24 especies. Algunas de las alteraciones ultramicroscópicas descriptas en el caninos son

1 alteración acrosómica, distribución irregular del contenido acrosómico e hinchamiento,
2 vesiculación de la membrana acrosomal externa, hinchamiento y pérdida de la homogeneidad
3 y densidad del contenido acrosómico (Jurado y col., 2008; Liakatas y col., 1982; Stornelli MA
4 y col., 2004a b). En los espermatozoides criopreservados caninos, la pieza media ha mostrado
5 signos de daño como vacuolización mitocondrial (Silva y col., 2009). Las alteraciones
6 halladas con más frecuencia se observan en las membrana plasmática y acrosomal y las
7 mitocondrias (Ardrit y col., 2006). Estudios ultramicroscópicos realizados por algunos
8 investigadores sugieren que el acrosoma es una estructura especialmente sensible, siendo el
9 porcentaje de acrosomas dañados uno de los factores que compromete la fertilidad de los
10 espermatozoides (Christensen y col., 1992; Grondahl y col., 1994; Blottner y col., 2001).

11 Ardrít y col., congelaron espermatozoides de elefante utilizando 2 diluyentes
12 diferentes, uno con el agregado de GLY y otro con el agregado Dimetil sulfóxido (DMSO;
13 Ardrít y col., 2006). El estudio ultraestructural permitió observar un mayor porcentaje de
14 espermatozoides morfológicamente normales en las muestras congeladas con el diluyente que
15 contenía GLY. Este resultado podría atribuirse a la toxicidad del DMSO ya que ambos medios
16 poseían osmolalidades similares (1480 mOsm DMSO vs 1478 mOsm GLY; Ardrít y col.,
17 2006). Es así que el estudio ultraestructural del semen congelado-descongelado permite
18 observar no solo la ocurrencia del daño celular sino también la estructura afectada
19 permitiendo estimar el impacto protector del diluyente (Jurado y col., 2008; Savignone y col.,
20 2008).

21 En bovinos la etapa de enfriamiento causa hinchamiento del acrosoma, mientras que al
22 congelar-descongelar se observó ruptura del acrosoma y de la pieza media (Jones y Stewart,
23 1979). En humanos se observaron sólo ligeros cambios en la ultraestructura celular luego de
24 la dilución y al congelado, como hinchamiento de la membrana acrosomal, contenido

1 acrosomal menos homogéneo, con acrosomas hinchados y aumento de la heterogeneidad
2 acrosomal (Wolley y Richardson, 1978). En el mencionado trabajo se observaron los mayores
3 cambios durante el proceso de descongelado. Sin embargo, durante el enfriado y congelado el
4 espermatozoide puede sufrir cambios subletales que no se detectados microscópicamente
5 (Wolley y Richardson, 1978).

6 Según Pukazhenthí y col., el enfriado rápido induce daño acrosomal sin alterar la
7 motilidad espermática en el canino (Pukazhenthí y col., 1999). Un trabajo en caninos reveló
8 que durante la dilución no se produjeron cambios significativos en la ultraestructura; sin
9 embargo, el enfriado causó un aumento de alteraciones acrosomales con consecuencias en la
10 viabilidad espermática (Burguess y col., 2001). Es decir, que las distintas estructuras de la
11 célula muestran diferente susceptibilidad al estrés físico-químico que ocurre durante la
12 criopreservación (Blottner y col, 2001; Pukazhenthí y col., 1999; Nagy y col., 1999).

13 Un trabajo realizado en ovinos en el cual se realizó el estudio ultramicroscópico del
14 semen criopreservado, sugiere que el efecto ejercido por el tipo de diluyente utilizado y el
15 proceso empleado de congelación son especie-específicos (Cabrita y col., 2011). Es así que
16 las alteraciones espermáticas encontradas al MET pueden variar entre las diferentes especies.

17 En la especie felina existe una gran variabilidad individual en los parámetros
18 seminales hecho, que influye en la calidad y capacidad fecundante del semen. A pesar de los
19 avances en la microscopía electrónica de transmisión son pocos los trabajos que estudian el
20 espermatozoide en esta especie (Long y col., 1996; Pukazhenthí y col., 1999; Tebet y col.,
21 2006). Debido a que aún no se encuentran estandarizados los protocolos de congelación para
22 la preservación de EF, la utilización de la ME podría brindar datos que permitan mejorar los
23 protocolos de congelación con el consecuente aumento de la supervivencia espermática al
24 descongelado. Es así que el estudio ultramicroscópico resultaría de gran valor para evaluar el

1 tipo y frecuencia de daño para determinar el comportamiento de un diluyente en los diferentes
2 compartimentos celulares.

3 El objetivo del presente experimento fue estudiar las alteraciones ultramicroscópicas
4 observadas en los EF congelados-descongelados y caracterizar el tipo de daño según el
5 diluyente utilizado. La hipótesis fue que los EF congelados-descongelados presentan
6 alteraciones ultraestructurales relacionadas con la formulación del diluyente utilizado.

7

8 MATERIALES Y MÉTODOS

9 Experimento 9

10 Se realizó el estudio ultraestructural de los EE frescos y los EE congelados-
11 descongelados de cada uno de los diluyentes utilizados en los experimentos 1, 3, 5 y 7, con el
12 fin de estudiar los cambios que provocan los procesos de congelación-descongelación sobre la
13 célula espermática en relación al diluyente utilizado (Jurado y col., 2008).

14

15 *Estudio ultraestructural-Microscopía electrónica de transmisión*

16 Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2 % en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4). Se
17 centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos y el pellet obtenido permaneció en el fijador
18 durante 2 hs a 4 °C. La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1 % durante 1
19 hora a 4 °C y posteriormente, los espermatozoides se deshidrataron en una serie creciente de
20 alcoholes y se incluyeron en resina Epoxi (Jurado y col., 2008). Los cortes ultrafinos (90 nm)
21 se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Estas muestras se examinaron con
22 un MET JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokio, Japón) y se fotografiaron con una cámara
23 Erlangshen ES1000W, Modelo 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA) del Servicio

1 Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Se
2 evaluaron 100 cabezas y 100 colas.

3 Los EF criopreservados se descongelaron y procesaron de la misma forma que los EF
4 frescos.

5 Se calculó el IC de la contrastación ultramicroscópicas de acuerdo a la siguiente
6 ecuación: (IC=valor de la contrastación descongelado/valor de la contrastación en fresco).

7

8 **Análisis estadístico**

9 Los datos se analizaron mediante ANOVA con PROC GLM de SAS (SAS, 2003).

10

11 **Marco bioético del uso de animales**

12 Los experimentos se realizaron respetando las mismas consideraciones bioéticas
13 especificadas en experimento 1 del capítulo II.

14

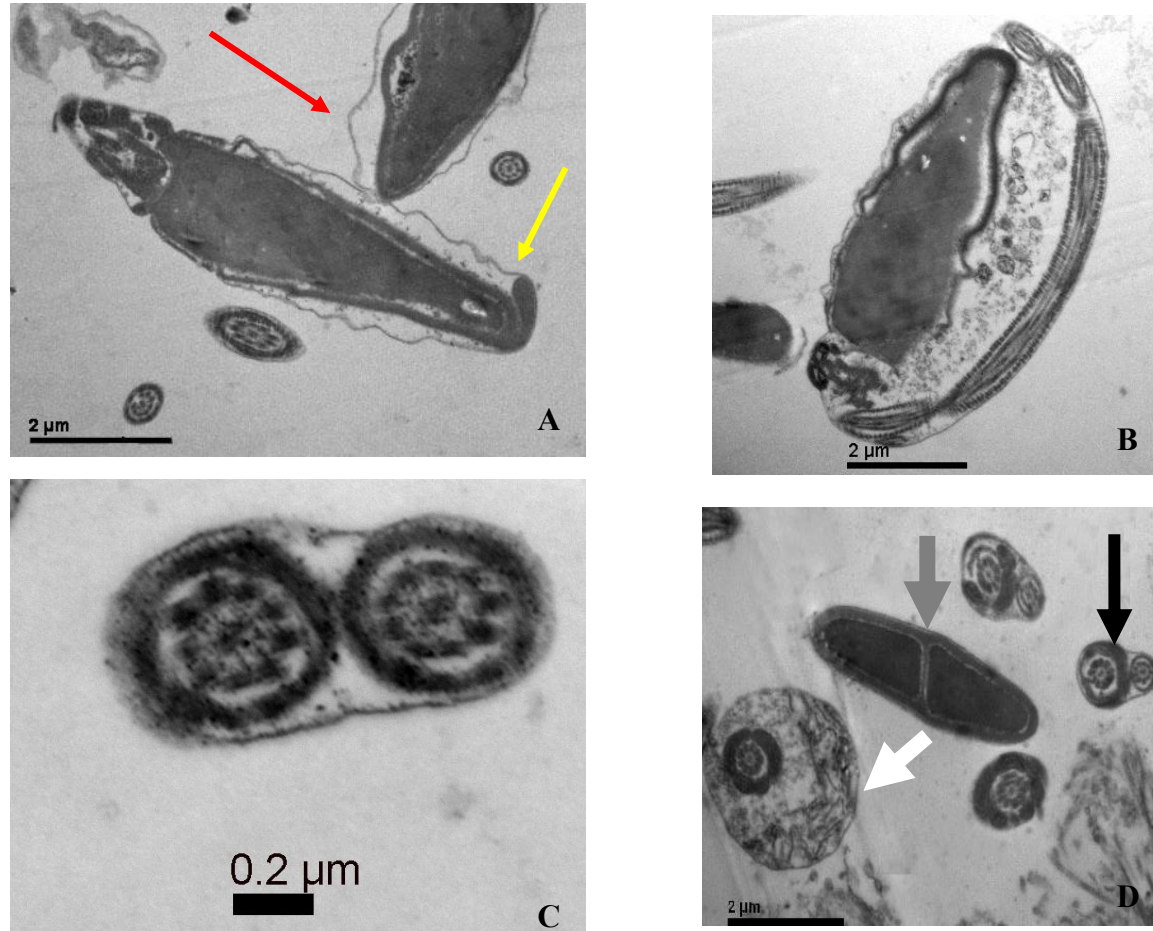
15 **RESULTADOS**

16 **Estudio ultramicroscópico de EE**

17 En los EE frescos el $58,8 \pm 5,66\%$ de las cabezas y el $83,5 \pm 9,59\%$ de las colas
18 mostraron morfología normal al ME. En algunas células se observó la presencia de
19 anormalidades como alteraciones acrosomales (Liping, que en algunos casos presentaba un
20 espacio en su interior sin contenido acrosomal), núcleos con “vacuolas” en su interior, defecto
21 de “Dag”, colas dobles, cabezas dobles, axonemas incompletos (Figura 6.1 A-D).

22 En las muestras de EE congelados-descongelados, las alteraciones ultraestructurales
23 observadas fueron: hinchazón, formación de pliegues y ruptura en la membrana plasmática y

- 1 acrosomal, vesiculación en la membrana acrosomal externa y plasmática y vacuolas
- 2 mitocondriales (Figura 6.2 A-D).



Gafico 6.1. Evaluación ultrmicroscópica de espermatozoides frescos. A; Corte longitudinal a nivel de la cabeza. Se observan acrosomas defectuosos (flecha roja), lipping (flecha amarilla); B: Defecto de "Dag": caracterizado por el enrollamiento de la cola alrededor de la cabeza envuelta por una membrana plasmática intacta; C: Se observan colas dobles; D: Se observan cabeza doble (flecha gris), gota citoplasmática (flecha blanca), colas dobladas (flechas negras).

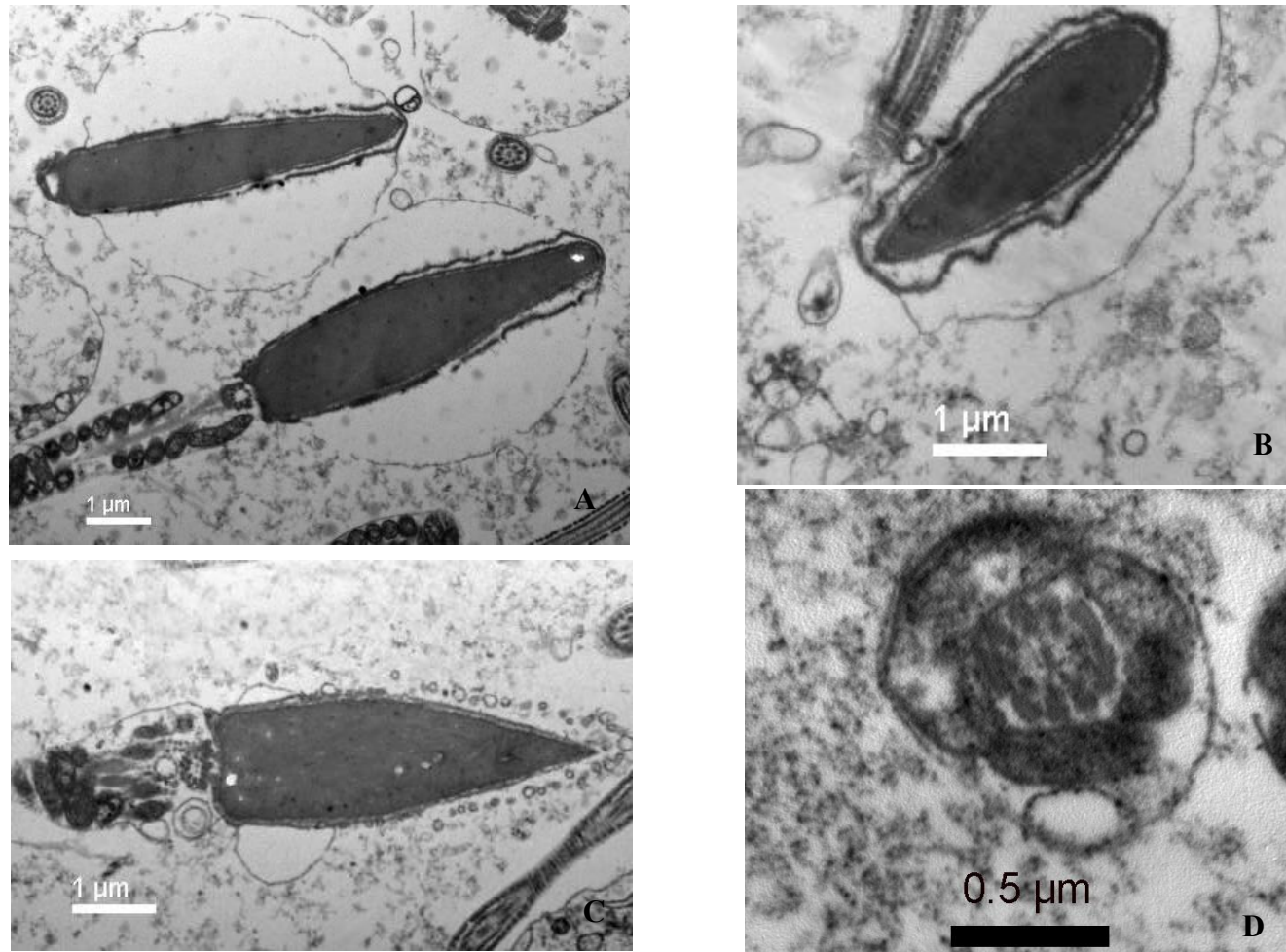


Figura 6.2. Evaluación ultramicroscópica de espermatozoides congelados-descongelados. A: Membrana plasmática muy hinchada, membrana acrosomal ligeramente hinchada; B: Membrana plasmática y acrosomal muy hinchadas; C: Fusión de las membranas acrosomales y formación de vesículas; D: Mitocondrias hinchadas.

En todos los experimentos el porcentaje de EE sin daños ultramicroscópicos fue significativamente mayor tanto en las cabezas como en las colas en los EE frescos en comparación con los EE congelados-descongelados (Tabla 6.1 y 6.2).

Tabla 6.1. Porcentaje de cabezas espermáticas normales en espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados en cada uno de los experimentos.

EE FRESCOS	TREA ^A	DMF ^B	SDS ^C	TREASDS
58,8±5,66	20,18±9,14	10,25±1,24	25±4,15	20,37±2,06

^ATrealosa; ^BDimetilformamida; ^CDodecil Sulfato de Sodio

Tabla 6.2. Porcentaje de colas espermáticas normales en espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados en cada uno de los experimentos.

EE FRESCOS	TREA ^A	DMF ^B	SDS ^C	TREASDS
83,5±9,59	67,7±3,09	59,27±3,92	54,07±4,3	48,25±3,59

^ATrealosa; ^BDimetilformamida; ^CDodecil Sulfato de Sodio

En las muestras procesadas en el experimento 1, se observó una tendencia a proteger más las cabezas de los espermatozoides congelados con TREA vs el diluyente TRIS (22,04±4,45 vs 18,33±3,69 % de cabezas normales respectivamente).

En las muestras procesadas en el Experimento 3, se observó una tendencia a proteger más las colas de los espermatozoides congelados con el diluyente TRIS vs el diluyente con DMF (64,66±11,18 vs 52,8±5,39% de respectivamente).

En las muestras procesadas en el experimento 5, se observó una tendencia a proteger más las cabezas de los espermatozoides congelados con el diluyente SDS vs el diluyente TRIS (28,58±5,474 vs 21,42±5,47% respectivamente).

1 En las muestras procesadas en el experimento 7, se observó una tendencia a proteger
2 las muestras congeladas-descongeladas con TREA+SDS cuando se las comparó con el
3 diluyente TRIS tanto para las cabezas como para las colas ($24,18 \pm 3,94$ vs $17,33 \pm 1,65$;
4 $53,55 \pm 6,99$ vs $42,95 \pm 1,28$ respectivamente).

5 La localización de los daños ocurridos durante la congelación-descongelación de los
6 EE en los distintos experimentos pueden observarse en la Tabla 6.3 y 6.4.

1 Tabla 6.3. Porcentaje de daños espermáticos observados en las cabezas de los
 2 espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados.

	EE Frescos (%)	EE Congelados- descongelados (%)
Acrosoma irregular	0,21	1,5
Espacio subacrosomal	0,44	1,65
MP ^A hinchada +	8,55	3,53
MP hinchada ++	5,63	2,06
MP hinchada +++	0,2	2,79
MP hinchada sin acrosoma	0,45	7,13
MP hinchada y contenido acrosomal heterogéneo	0	1,76
MP hinchada y menor contenido acrosomal	0	5,3
MP rota	13,44	19,78
MP rota y contenido acrosomal heterogéneo	0,45	1,36
MP y acrosomal hinchadas	0	1,32
MP y acrosomal vesiculadas	1,6	22,47
Menor contenido acrosomal	0	4,37
Otras alteraciones	10,23	6,03
Total	41,2	81,05

3 ^AMembrana plasmática

1 Tabla 6.4. Porcentaje de daños espermáticos observados en las colas de los espermatozoides
 2 epididimales frescos y congelados-descongelados.

	EE Frescos (%)	EE Congelados- descongelados (%)
Membrana plasmática hinchada	5,65	18,05
Membrana plasmática hinchada y mitocondrias vacuoladas	0,22	0,77
Mitocondrias vacuoladas	2,44	14,8
Pérdida de estructura	1,44	1,3
Pérdida de microtúbulos	4,88	4,18
Otras alteraciones	1,87	3,58
Total	16,5	42,68

3

4 Se puede observar que las dos alteraciones más frecuentes en la cabeza de los EE
 5 criopreservados son la membrana plasmática y acrosomal vesiculadas y la membrana
 6 plasmática rota (22,47% y 19,78%, respectivamente). Mientras que en la cola los daños más
 7 frecuentes fueron la membrana plasmática hinchada y la presencia de vacuolas en las
 8 mitocondrias (18,05% y 14,8%, respectivamente).

9

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran un gran número de EF frescos con daños ultraestructurales. Este hecho podría atribuirse al procesamiento al que son sometidos los espermatozoides para ser evaluados al MET. Algunos autores han demostrado que los espermatozoides de felinos teratospérmicos, son más susceptibles al proceso de enfriamiento y criopreservación (Howard y col., 1993; Wildt, 1994; Pukazhenthil y col., 1999). Tal vez esto mismo ocurra con el proceso al que las células son sometidas para su estudio mediante ME.

Así mismo fue posible observar la presencia de algunas anormalidades como defecto de Dag, cabezas y colas dobles, alteración de los axonemas, siendo estas alteraciones similares a las halladas en trabajos realizados en caninos (Stornelli MA, 2004; Jurado y col., 2008). Como hemos citado anteriormente, el felino doméstico es considerado teratospérmico; las anormalidades acrosómicas encontradas en nuestro trabajo concuerdan con las observadas por otros autores (Long y col., 1996; Tebet y col., 2006). En nuestras muestras pudimos observar la presencia de algunas vacuolas en el núcleo de las células espermáticas que también se han detectado en humanos y en el felino doméstico (Mortimer, 1994; Long y col., 1996). La cromatina del espermatozoide humano está altamente condensada con una densidad homogénea al ME, aunque la presencia de pequeñas vacuolas puede ser común lo que coincidiría con nuestros hallazgos. (Mortimer, 1994). Por otro lado, el estudio ultramicroscópico realizado nos permitió evaluar el grado de daño producido por los procesos de congelación-descongelación sobre las células espermáticas y sus estructuras. Estos resultados concuerdan con lo observado en caninos por Stornelli y col., quienes comunicaron un porcentaje mayor de alteraciones espermáticas en las muestras congeladas-descongeladas cuando se las comparó con el semen fresco (Stornelli MA y col., 2004a; Stornelli MA y col., 2007c). En bovinos, ovinos, porcinos, Chinchilla y humanos los resultados del estudio

1 ultramicroscópico del semen criopreservado han demostrado mayor cuantía de daño en
2 espermatozoides congelados-descongelados en comparación con las muestras de
3 espermatozoides frescos, hecho coincidente con lo observado en nuestro trabajo (Jones y
4 Stewart, 1979; Quinn y col., 1969; Nath, 1972; Pedersen y Lebech, 1971; Healey, 1969).

5 En concordancia con otros autores, en nuestro trabajo, los principales daños se
6 observaron en la membrana plasmática, membrana acrosomal y en las mitocondrias (Jurado y
7 col., 2008; Rodriguez-Martinez y col., 1993; Ström y col., 1998; Silva y col., 2009). De
8 acuerdo con lo descrito por Tebet y col., hay una alta incidencia de alteraciones acrosomales
9 observados luego de la criopreservación (Tebet y col., 2006). La ondulación de la membrana
10 acrosomal fue frecuente y coincidió con lo observado en caninos (Burguess y col., 2001). Lo
11 mismo ocurrió con otras alteraciones observadas como la vesiculación de la membrana
12 acrosomal y pérdida del contenido acrosomal, los cuales podrían ser signos de falsa reacción
13 acrosomal (RA; Eilts, 2005; Rodriguez-Martinez y col., 1993; Alvarenga y col., 2000; Jurado
14 y col., 2008; Stornelli, MA 2004; Mansilla Hermann y col., 2012). Para Yanagimachi y Noda
15 el hinchamiento acrosomal es un estado previo a la RA (Yanagimachi y Noda, 1970).

16 En concordancia con Ardit y col., nuestras observaciones sugieren que la
17 criopreservación induce también un daño en las mitocondrias, y que esto podría ser la causa
18 de la baja motilidad espermática al descongelado (Ardit y col., 2006). Las vacuolas
19 encontradas en las mitocondrias de los espermatozoides criopreservados podrían estar
20 relacionadas con el acumulo de agua o con un proceso degenerativo, hecho descrito por
21 algunos autores en relación al fenómeno de apoptosis celular (Silva y col., 2009; Blanc-
22 Layrac y col., 2000). Se ha descrito que luego de la formación de cristales de hielo durante la
23 congelación estos pueden causar daño intracelular (Woolley y Richardson, 1978; Gao y col.,
24 1995; Watson, 1976; Watson, 1981; Watson y Duncan, 1988). En humanos, las

1 anormalidades ubicadas a nivel mitocondrial afectan directamente la motilidad espermática
2 afectando la fertilidad (Rao y col., 1989; Grunewald y col., 2008). La integridad funcional de
3 la mitocondria podría ser fundamental para la supervivencia espermática en el tracto genital
4 femenino (Silva y col., 2009).

5 Para mantener el potencial fértil de los espermatozoides luego del proceso de
6 criopreservación, es necesario mantener la integridad estructural como funcional de las
7 membranas. Por lo tanto, los daños hallados en nuestro estudio podrían comprometer la
8 capacidad fecundante de los espermatozoides. En equinos un aumento en los espermatozoides
9 con daño en la membrana es indicador de reducción de la fertilidad (Zhang y col., 1990;
10 Grondahl y col., 1994). Stornelli y col., concluyeron que las alteraciones observadas al MET
11 en el semen criopreservado en caninos, afectan la funcionalidad y capacidad fecundante de
12 esos espermatozoides (Stornelli MA y col, 2004a; Jurado y col., 2005; Mansilla Hermann y
13 col., 2012). Por lo tanto, podríamos hipotetizar que lo mismo sucede con los EF que han
14 sufrido daños y no han resistido el proceso de criopreservación. Sin embargo, son necesarias
15 pruebas de fertilidad para confirmar esta hipótesis.

16 Woolley y Richardson evaluaron la ultraestructura del espermatozoide humano
17 durante las distintas etapas del proceso de congelación-descongelación detectando, al igual
18 que lo observado por nosotros en el felino doméstico, una disminución de células íntegras
19 luego del proceso de criopreservación (Woolley y Richardson, 1978). Así mismo, en sus
20 observaciones destacaron alteraciones acrosomales como hinchazón y aumento de la
21 heterogeneidad del contenido acrosomal, estando limitado al segmento apical, ya que el
22 segmento ecuatorial se mantuvo inalterado (Woolley y Richardson, 1978). Nuestros
23 resultados muestran que en el felino doméstico las alteraciones que predominan en la cabeza

1 son la ruptura o hinchazón, en distintos grados, de la membrana plasmática y ausencia del
2 acrosoma.

3 En nuestros resultados se observa una tendencia a proteger las cabezas de los EE
4 criopreservados con los diluyentes que contenían TREA y TREA+SDS con respecto a
5 aquellos diluyentes que no los contenían o que estuvieron compuestos por DMF o SDS. En el
6 ovinos se observó una reducción del número de daños en los espermatozoides que fueron
7 criopreservados en un diluyente que contenía TREA, comparado con uno que no lo contenía o
8 que conjugó TREA-EDTA (Aisen y col., 2005). En este trabajo observaron que la TREA
9 conservó la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, especialmente en la región
10 apical (Aisen y col., 2005). Tal vez esta diferencia utilizando el mismo disacárido, pudo
11 deberse a las diferentes concentraciones de TREA utilizadas en ambos trabajos.

12 Las estructuras celulares tienen diferente susceptibilidad frente a distintas condiciones
13 fisicoquímicas causantes de estrés celular, hecho que varía entre las especies, y que podría
14 determinar las diferencias en el tipo de alteración que se presenta en mayor cuantía (Blottner y
15 col., 2001). Así mismo, se ha demostrado que la membrana que rodea la cabeza difiere en
16 estructura y permeabilidad de la membrana que rodea el flagelo factor que podría explicar la
17 diferencia en la cuantía de daño observada en la cola y la cabeza (Courstens y col., 1989).
18 Existen trabajos que demuestran la relación entre el tipo y localización del daño y el impacto
19 de distintos componentes incluidos en el diluyente para mejorar el efecto protector (Stornelli
20 MA y col., 2004b; Stornelli MA y col., 2007c). En el elefante el grado de daño fue
21 dependiente de la concentración de DMSO en el diluyente de congelación (Ardtit, 2006). Es
22 así que las variaciones de temperatura durante los distintos pasos causan cambios en la
23 composición y estructura de la membrana (Ardtit, 2006). Probablemente la re-cristalización
24 que ocurre durante el descongelado genere alguno de los daños intracelulares que se detectan

1 en el ME (Wolley y Richardson, 1978). Sin embargo, es posible que durante el enfriado y
2 congelado el espermatozoide experimente cambios sutiles que no son detectados por
3 microscopía (Wolley y Richardson, 1978).

4 La localización celular de los daños observados al descongelado en los EF estudiados
5 en nuestro trabajo concuerda con los sitios de daño descritos en otras especies, luego de que
6 los espermatozoides fueran sometidos al proceso de enfriado, congelado y descongelado
7 (Jurado y col., 2008, Jones y Stewart, 1979; Quinn y col., 1969; Ardit, 2006). El estudio
8 ultramicroscópico de los EF nos permitió observar alteraciones ultraestructurales que no se
9 pueden detectar por otros métodos de evaluación seminal.

10 Podemos concluir, que el estudio ultramicroscópico reveló un mayor porcentaje de
11 alteraciones en los EF congelados-descongelados en comparación con los espermatozoides
12 frescos, hecho que muestra que el proceso de criopreservación afecta a la célula espermática
13 como ha sido demostrado en otras especies.

14 Se observó una tendencia a proteger más las cabezas de los espermatozoides
15 congelados con TREA y con SDS al compararlo con el diluyente TRIS, así como una
16 tendencia a proteger tanto las cabezas como las colas con el diluyente TREA+SDS
17 comparado con el TRIS. El estudio de mayor número de muestras permitirá definir si esta
18 tendencia marca un efecto protector del disacárido y/o el detergente sobre las estructuras arriba
19 mencionadas.

20 Los resultados obtenidos aportan datos que permiten avanzar en el estudio del proceso
21 de criopreservación en el felino doméstico.

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo no se observaron diferencias en el origen de los EF, concluyendo que los espermatozoides epididimales y los espermatozoides eyaculados felinos responden de igual forma al proceso de congelación-descongelación.

La adición de TREA en las condiciones experimentales y a la concentración utilizada no produjo variaciones en los parámetros seminales evaluados. Es posible que los EF necesiten un diluyente con mayor concentración de TREA a las utilizadas, sin que ésta eleve la osmolalidad a un nivel que afecte la viabilidad espermática, para observar la acción protectora del disacárido. El reemplazo de parte del glicerol por DMF a un diluyente Tris base no mejoró la supervivencia espermática al descongelado en felinos, bajo las condiciones experimentales realizadas. La adición de SDS a un diluyente Tris base, ejerce un efecto protector mayor que un diluyente Tris base sin el agregado de SDS sobre los espermatozoides felinos congelados-descongelados. Así mismo, un diluyente que contenga en su composición SDS y TREA, ejerce un efecto protector mayor sobre los espermatozoides felinos congelados-descongelados que un diluyente Tris base sin el agregado de TREA+SDS.

El felino doméstico presenta un gran número de espermatozoides con anormalidades estructurales, algunas las cuales podrían hacer más sensible a los espermatozoides felinos al proceso de congelación. El proceso de congelación-descongelación genera daños estructurales y ultraestructurales en los espermatozoides felinos que podrían comprometer su capacidad fecundante.

BIBLIOGRAFÍA

- 1
- 2 1. Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA. Studies in the presence and absence of
- 3 glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Fertility trials and the effect of dilution
- 4 methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology* 1991; 28:36-
- 5 42.
- 6 2. Aboagla EM, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and
- 7 its protection during freezing. *Biol Reprod* 2003; 69(4):1245-50.
- 8 3. Aboagla EM, Terada T. Effects of egg yolk during the freezing steps of
- 9 cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 2004b;
- 10 62(6):1160-72
- 11 4. Aboagla EM, Terada T. Effects of the supplementation of trehalose extender
- 12 containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat
- 13 spermatozoa. *Theriogenology* 2004a; 62(5):809-18.
- 14 5. Ahmad K, Foote RH. Postthaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated
- 15 with antibiotics and detergent. *J. Dairy Sci* 1986; 69(2):535-41.
- 16 6. Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A. Ultramicroscopic and
- 17 biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based
- 18 hypertonic extenders. *Cryobiology* 2005; 50:239-49.
- 19 7. Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. Effect of trehalose and edta on
- 20 cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 2000; 53(5):1053-61.
- 21 8. Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility ram
- 22 semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology* 2002; 57(7):1801-
- 23 8.
- 24 9. Allen TE, Bobr LW. The fertility of fowl spermatozoa in glycerol diluents after
- 25 intrauterine inseminations. *Poultry Sci* 1955; 34(5):1167-9.
- 26 10. Aloia, R.C., Curtin, C.C., Gordon, L.M. Lipid Domains and the relationship to
- 27 membrane function. In: Alan R. Liss, Inc, New York; 1988:301.
- 28 11. Alvarenga MA, Landim Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM.. Acrosomal
- 29 ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two
- 30 packaging systems. *Equine Vet J* 2000; 32(6):541-5.

- 1 12. Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC, Papa FO, Medeiros ASL. Amides as
2 cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. Anim Reprod Sci 2005; 89(1-4):
3 105-13.
- 4 13. Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF. Crowe JH. Modes of interaction of
5 cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. Cryobiology 1987;
6 24(4):324-31.
- 7 14. Ardrit S, Saikhun J, Thongtip N, Damyang M, Mahasawangkul S, Angkawanish T,
8 Jansittiwate S, Faisaikarm T, Kitiyanant Y. Pavasuthipaisit K, Pinyopummin K.
9 Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*)
10 spermatozoa. Interational Journal Andrology 2006; 29(2):346-52.
- 11 15. Armitage WJ. Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human
12 platelets. 231 Cryobiol 1986; 23(2):116-25.
- 13 16. Arriola J, Foote RH. Glycerolation and thawing effect on bull spermatozoa frozen in
14 detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. J. Dairy Sci 1987; 70(8):1664-70.
- 15 17. Ashwood-Smith MJ. Mechanisms of cryoprotectant action. In: Bowler, K, Fuller, BJ,
16 eds. Temperature and Animal Cells. Cambridge: The company of Biologists, Ltd.;
17 1987, 395-406.
- 18 18. Axner E. Updates on reproductive physiology, genital diseases and artificial
19 insemination in the domestic cat. Reprod Dom Anim 2008; 43(2):144-9.
- 20 19. Axner E, Lind-Forsberg C. Sperm Morphology in the Domestic Cat, and its Relation
21 with Fertility: A Retrospective Study. Reprod Domest Anim 2007; 42(3):282-91.
- 22 20. Axner E, Hermansson U, Linde-Forsberg C. The effect of Equex STM paste and
23 sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. Anim
24 Reprod Sci 2004; 84(1-2):179-91.
- 25 21. Axner E, Linde-Forsberg C. Semen collection and assessment, and artificial
26 insemination in the cat. En: Recent advances in small animal reproduction. Concannon
27 PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C (eds). Publisher: International
28 Veterinary Information Service (<http://www.ivis.org>). Ithaca, New York, USA 2002.
- 29 22. Axner E, Linde-Forsberg C. Mating and artificial insemination in domestic cats. En:
30 Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology (eds) Simpson G., England
31 GCW and Harvey MJ. Cheltenham: BSAVA, 1998; p. 105-11.

- 1 23. Axner E, Malmqvist M, Linde-Fosberg C, Rodriguez-Marinez H. Regional histology
2 of the ductus epididymidis in the domestic cat. *J Reproduction and Development*
3 1999; 45(2):151-60.
- 4 24. Axner E, Strom-Holst B, Linde-Forsberg C. Morphology of spermatozoa in the cauda
5 epididymis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated
6 spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 1998; 50(6):973-9
- 7 25. Baccetti B, Capitani G, Collodel E, Strehler E, Piomboni P. Recent advances in human
8 sperm pathology. *Contraception* 2002; 65(4):283-7.
- 9 26. Baccetti B, Bernieri G, Burrini AG, Collodel G, Crisà N, Mirolli M, Moretti
10 E, Piomboni P. *Notulae seminologicae*. 5. Mathematical evaluation of interdependent
11 submicroscopic sperm alterations. *J Androl* 1995; 16(4):356-71.
- 12 27. Bakas LS, Disalvo EA. Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose.
13 *Cryobiology* 1991; 28(4):347-53.
- 14 28. Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble
15 cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane
16 potential. *J Androl* 2001; 22(6):1061-9.
- 17 29. Baran A, Bacinoglu S, Evecen M, Sahin BE, Alkan S, Demir K, AK K, Ileri K.
18 Freezing of Cat Semen in Straws with Different Glycerol Levels Containing Tris
19 Extender. *Turk J Vet Anim Sci* 2004; 28:545-52.
- 20 30. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell*
21 *Tissue Bank* 2009; 10(1):49-62.
- 22 31. Barthelemy C, Royere D, Hammahah S, Levos C, Thtaranne M, Lanzac J.
23 Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during
24 cryopreservation. *Arch Androl* 1990; 25(1):29-40.
- 25 32. Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Scmitt E, Desherces S,
26 Delhomme G, Langlois ML, Barriere P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D.
27 The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with
28 TRIS egg yolk and Equex[®] STAMP extenders in the cryopreservation of canine
29 semen. *Res Vet Sci*. 2012; 93(1):440–7.
- 30 33. Bergeron A, Manjunath P. New insights toward understanding the mechanism of
31 sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 2006; 73(10):1338-44.

- 1 34. Berlinguer F, Leoni GG, Succu S, Mossa F, Galioto M, Madeddu M, Naitana S.
2 Cryopreservation of European Mouflon (*Ovis gemilini musimon*) semen during the
3 non-breeding season is enhanced by the use of trehalose. *Reprod Dom Anim* 2007;
4 42(2):202-7.
- 5 35. Bezerra FSB, Castelo TS, Alves HM, Oliveira IRS, Lima GL, Peixoto GCX, Bezerra
6 ACSD, Silva AR. Objective assessment of the cryoprotective effects of
7 dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology* 2011; 63(3):263-6.
- 8 36. Bianchi I, Calderam K, Maschio EF, Madeira EM, da Rosa Ulguim R, Corcini CD,
9 Bongalhardo DC, Correa EK, Lucia Jr. T, Deschamps JC, Correa MN. Evaluation of
10 amides and centrifugation temperatura in boar semen cryopreservation.
11 *Theriogenology* 2008; 69(5):632-8.
- 12 37. Blanc-Layrac, Bringuier AF, Guillot R, Feldmann G. Morphological and biochemical
13 analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. *Cell Mol Biol* 2000;
14 46(1):187-97.
- 15 38. Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen, V, Torner H. Morphological and
16 functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and
17 non-breeding season. *Anim Reprod Sci* 2001; 65(1-2):75-88.
- 18 39. Bucak MN, Atessahin A, Varissli O, Yuce AA, Tekin N, Akcay A. 2007. The
19 influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic
20 and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* 2007;
21 67:1060-7.
- 22 40. Buranaamnauy K. Determination of appropriate cryopreservation protocols for
23 epididimal cat spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2015; 50(3):378-85.
- 24 41. Burgess CM, Bredl JC, Plummer JM, England GC. Vital and ultrastructural changes in
25 dog spermatozoa during cyopreservation. *J Reprod Fertil Suppl* 2001; 57:357-63.
- 26 42. Cabrita E, Ma S, Diogo P, Martínez-Páramo S, Sarasquete C, Dinis MT. The influence
27 of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and
28 DNA fragmentation. *Anim Reprod Sci* 2011; 125(1-4):189-95.
- 29 43. Cárdenas J. Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente
30 comercial (Triladyl) en la congelación de semen bovino. *Maestría en Reproducción*
31 *Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca.* 2013.

- 1 44. Chatdarong K, Axner E, Manee-In S, Thuwanut P, Linde-Forsberg C. Pregnancy in
2 the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen
3 semen. *Theriogenology* 2007; 68(9):1326–33.
- 4 45. Chatdarong K, Ponglowhapan S, Manee-in S, Pongphet K. The use of propofol for
5 electroejaculation in domestic cat. *Theriogenology* 2006; 66(6-7):1615-7.
- 6 46. Chatdarong K, Thuwanut P, Suksamai P, Patanatiradaj S, Sangwornrachasup A.
7 Survival of Frozen-Thawed Cat Spermatozoa Pre-Cooled in the epididymides. *Reprod*
8 *Dom Anim* 2009; 44(2):377-80.
- 9 47. Chatdarong K, Thuwanut P, Manee-in S, Lohachit C, Axner E. Effects of thawing
10 temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa. *Reprod Domest*
11 *Anim* 2010; 45(2):221-7.
- 12 48. Chen T, Fowler A, Torner M. Literature Review: Supplemented phase diagram of the
13 trehalose–water binary mixture. *Cryobiology* 2000; 40:277-82.
- 14 49. Chen Y, Foote RH, Brockett CC. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine,
15 and bood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology* 1993; 30(4): 423-31.
- 16 50. Cheng FP, Wu JT, Chan JPW, Wang JS, Fung HP, Colenbrander B, Tung KC. The
17 effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and
18 longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer.
19 *Theriogenology* 2004; 61(9):1605-16.
- 20 51. Chhillar S, Singh VK, Kumar R, Atreja SK. Effects of taurine or trehalose
21 supplementation on functional competence of cryopreserved Karan Fries semen. *Anim*
22 *Reprod Sci* 2012; 135(1-4):1-7.
- 23 52. Christensen P; Parlevliet J; Van Buiten A; Hyttel P; Colenbrander B. Ultrastructure of
24 fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. En: *Proceeding of the VIth International*
25 *Symposium Equine Reproduction* 1992; pp 197-8.
- 26 53. Cirit U, Bagis H, Demir K, Agca C, Pabuccuoglu S, Varisli O, Clifford-Rathert C,
27 Agca Y. Comparison of cryoprotective effect of iodixanol, trehalose and cysteamine
28 on ram semen. *Anim Reprod Sci* 2013; 139(1-4):38-44.
- 29 54. Claassens OE, Menkveld R, Franken DR, Pretorius E, Swart Y, Lombard CJ, Kruger
30 TF. The Acridine Orange test: determining the relationship between sperm
31 morphology and fertilization *in vitro*. *Hum Reprod.* 1992; 7(2):242-7.

- 1 55. Cocchia N, Ciani F, El-Rass R, Russo M, Borzacchiello G, Esposito V, Montagnaro S,
2 Avallone L, Tortora G, Lorzio R. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa
3 from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote* 2010;
4 18(1):1-8.
- 5 56. Comizzoli P, Mermillod P, Mauget R. Reproductive biotechnologies for endangered
6 mammalian species. *Reprod Nutr Dev* 2000; 40(5):493-504.
- 7 57. Concannon PW, Battista M. Canine semen freezing and artificial insemination. In:
8 Kirk RW. En: *Current Veterinary Therapy-small animal practice*. X, Philadelphia:
9 W.B. Saunders, 1989, p. 1247-59.
- 10 58. Courtens JL, Ekwall H, Paquignon M, Plöen L. Preliminary study of water and some
11 element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. *J Reprod*
12 *Fertil* 1989; 87(2):613-26.
- 13 59. Crespilho AM, Landim-Alvarenga FC, Papa FO. Infertilidade associada a defeito
14 microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por
15 microscopia electronica de trasmissao. *Ciencia rural* 2006; 36(5):1507-10.
- 16 60. Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, Anchoroguy TJ. Are freezing and dehydration
17 similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes
18 with biomolecules. *Proceeding of the 26th Ann. Mtg. Soc. Cryobiol. Symposium on*
19 *Cryosensitizing and cryoprotective agents; California; USA. 1989; p. 219-29.*
- 20 61. Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurell Wistrom C. Stabilization of dry
21 phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J* 1987; 242(1):1-10.
- 22 62. Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F. The Trehalose
23 Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry
24 State. *Cryobiology* 2001; 43(2):89-105.
- 25 63. Crowe LM, Mouradian R, Crowe JH, Jackson SA, Womersley C. Effects of
26 carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochim Biophys Acta*
27 1984; 779:141-50.
- 28 64. Curry MR, Watson PF. Osmotic effect on ram and human sperm membranes in
29 relation to thawing injury. *Cryobiology* 1994; 31(1):39-46.
- 30 65. Dadoune JP. Ultrastructural abnormalities of human spermatozoa. *Hum*
31 *Reprod* 1988; 3(3):311-8.

- 1 66. Dalimata AM, Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in
2 combination with trehalose and methylcellulose. *Theriogenology* 1997; 48(5):831-41.
- 3 67. Darin-Bennett A, White IG. Influence of the Cholesterol Content of Mammalian
4 Spermatozoa on Susceptibility to Cold-Shock. *Criobology* 1977; 14(4):466-70.
- 5 68. De Leeuw FE, De Leuw AM, Den Dass JH, Colenbrander B, Verkleij AJ. Effects of
6 various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm
7 membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 1993; 30(1):32-44.
- 8 69. Demick DS, Voss JL, Pickett BW. Effect of cooling, storage, glycerolization and
9 spermatozoa number on equine fertility. *J Anim Sci* 1976; 43(3):633-7.
- 10 70. Dewit M, Marley WS, Graham JK. Fertilizing potential of mouse spermatozoa
11 cryopreserved in a medium containing whole eggs. *Cryobiology* 2000; 40(1):36-45.
- 12 71. Díaz GB, Ojeda RA. Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina.
13 Mendoza, SAREM. (Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos), 2000, p
14 106.
- 15 72. Díaz GB, Ojeda RA. Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina.
16 Mendoza, SAREM. (Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos), 2012, p
17 193.
- 18 73. Dresser BL, Sehlhorst CS, Keller G, Kramer LW, Reece RW. Artificial insemination
19 and embryo transfer in the felidae. *Proceedings of International Symposium for World*
20 *Conservation Strategies for Tigers*, Cincinnati, Ohio, USA, 1986, p. 4-18.
- 21 74. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. Cold
22 shock damage is due to lipid phase-transitions in cell-membranes-a demonstration
23 using sperm as a model. *J Exp Zool* 1993; 265:432-7.
- 24 75. Dunphy BC, M Neal L, Cooke ID. The clinical value of conventional semen analysis.
25 *Fertil Steril* 1989; 51(2):324-9.
- 26 76. Fernandez-Santos MR, Martinez-Pastor F, Garcia-Macia V, Estes MC, Soler AJ, Paz
27 P, Anel L, Garde JJ. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex
28 effect on the cryopreservation of Iberian reed deer (*cervus elaphus hispanicus*)
29 epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 2007; 67(4):738-53.
- 30 77. Filho AC, Teles CHA, Jucá RP, Cardoso JFS, Uchoa DC, Campello CC, Silva AR,
31 Silva LDM. Dimethylformamide as a cryoprotectant of canine semen diluted and
32 frozen in ACP-106C. *Theriogenology* 2011; 76(7):1367-72.

- 1 78. Filliers M, Rijsselaere T, Bossaert P, Zambelli D, Anastasi P, Hoogewijs M, Van
2 Soom A. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: a comparison of two
3 collection techniques. *Theriogenology* 2010; 74(1):31-9.
- 4 79. Futino DO, Mendes MCB, Matos WNL, Mondadori RG, Lucci CM. Glycerol, Methyl-
5 Formamide and Dimethyl-Formamide in Canine Semen Cryopreservation. *Reprod*
6 *Dom Anim* 2010; 45(2):214-20.
- 7 80. Gao D, Mazur P, Critser JK. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa.
8 En: arrow AM, Critser JK. Editors. *Reproductive tissue baning*. Academic Press New
9 York, 1997, p. 263-328.
- 10 81. Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK. Hyperosmotic
11 tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and
12 sucrose on spermolysis. *Biol Reprod* 1993; 49(1):112-23.
- 13 82. Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mzur P, Critser ES,
14 Critser JK. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and
15 removal of glycerol. *Andrology: Hum Reprod* 1995; 10(5):1109-22.
- 16 83. García F, Nuñez Favre R, Stornelli MC, García Mitacek MC, Praderio RG, Stornelli
17 MA. Relación entre parámetros seminales y concentración de colesterol y triglicéridos
18 en plasma seminal felino. *Cs Morfol*; 2013; 15(2):62.
- 19 84. Gibb Z, Morris LHA, Maxwell WMC, Grupen CGG. Dimethyl formamide improves
20 the posthaw characteristics of sex-sorted and nonsorted stallion spermatozoa. *Anim*
21 *Reprod Sci* 2010; 121(1-2):216-7.
- 22 85. Gillan L, Evans G, Maxwel WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in
23 relation to fertility potential. *Theriogenology* 2005; 63(2):445–57
- 24 86. Gilmore JA, Liu J, Peter AT, Critser JK. Determination of Plasma Membrane
25 Characteristics of Boar Spermatozoa and Their Relevance of Cryopreservation. *Biol*
26 *Reprod* 1998; 58(1):28-36.
- 27 87. Gomes GM, Jacob JCF, Medeiros ASL, Papa FO, Alvarenga MA. Improvement of
28 stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga
29 Marchador breed. *Theriogenology* 2002; 58(2-4):277-9.
- 30 88. Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, Tomás C, Mocé E, de Mercado E. Effect of
31 different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after
32 cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 2012; 133(1-2):109-16.

- 1 89. Graham EF y Crabo BG. Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa.
2 Proc. 7th Int. Cong. Anim. Reprod. München 1972, Vol.2, pp 1627.
- 3 90. Graham JK, Moce E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*
4 2005; 64(3):492–504.
- 5 91. Grondahl C, Grondahl M, Hyttel P, Greve T. Acrosomal status in fresh and
6 frozen/thawed stallion spermatozoa evaluated by scanning electron microscopy. *Anat*
7 *Embryol (Berl)* 1994; 190(2):195-200.
- 8 92. Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Relationship between
9 sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int J of Andrology* 2008;
10 31(3):325-30.
- 11 93. Gutierrez-Perez O, Juarez-Mosqueda ML, Carvajal SU, Ortega ME. Boar spermatozoa
12 cryopreservation in low glicerol/trehalose enriched freezing media improves celular
13 integrity. *Cryobiology* 2009; 58(3):287-92.
- 14 94. Hammerstedt RH, Grahah JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm:
15 What we ask them to survive. *J Androl* 1990; 11(1):73-88.
- 16 95. Hammerstedt RH, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of
17 glycerol. *Cryobiology* 1992; 29(1):26–38.
- 18 96. Hanada A, Nagase H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J*
19 *Reprod Fertil* 1980; 60(1):247-52.
- 20 97. Harris RF, Pope CE, Gomez MC, Leibo SP, Dresser BL. Storage of domestic cat
21 spermatozoa for extended periods at 4°C. *Theriogenology* 2001; 55(1):308.
- 22 98. Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in
23 mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1990; 88(1):343-52.
- 24 99. Hay MA, Goodrowe KL. Comparative cryopreservation and capacitation of
25 spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J Reprod Fert*
26 *Suppl* 1993; 47:297-305.
- 27 100. Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL. Effects of cooling, freezing
28 and glycerol addition on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J Reprod*
29 *Fertil Suppl* 1997; 51:99-108.
- 30 101. Healey P. Effect of freezing on the ultraestructure of the spermatozoon of some
31 domestic animals. *J Reprod Fertil* 1969; 18(1):21-7.

102. Held JP. Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today's veterinary practice. Proceedings of the Canine Reproduction Symposium. Society for Theriogenology and American College of Theriogenologist, 1997, p. 49-59.
103. Hempling HG, White S. Permeability of cultured megakaryocytopoietic cells of the rat to dimethylsulfoxide. *Cryobiology* 1984; 21(2):133-43.
104. Hermansson U, Axnér E. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4 degrees C. *Theriogenology* 2007; 67(7):1239-48.
105. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000; 53(1):47-58.
106. Holt WV, Morris GJ, Coulson G, North RD. Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *J Exp Zool* 1998; 246(3):305-14.
107. Hori T, Kaseki H, Fukuhara Y, Oba H, Mizutani T, Kawakami E, Tsuitsui T. Effects of addition of Sodium Lauryl Sulfate on frozen-thawed canine spermatozoa. *J Vet Med Sci* 2006; 68(10):1125-8.
108. Howard J, Bush M, Wildt E. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zona pellucidae. *J Androl* 1991; 12(1):36-45.
109. Howard JG, Brown JL, Bush H, Wildt DE. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoa motility and morphology after swim-up processing. *J Androl* 1990; 11(3):204-15.
110. Howard JG, Donoghue AM, Johnston la, and Wildt DE. Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats. *Biol Reprod* 1993; 49(1):131-9.
111. Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Zhang SS, Zhao HW. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Reprod Domest Anim* 2009; 44(4):571-5.
112. Hu JH, Zan LS, Zhao XL, Li QW, Jiang ZL, Li YK, Li X. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen bovine semen. *J Animal Sci* 2010; 88(5):1657-62.

- 1 113. Isidori A, Latini M, Romanelli F. Treatment of male infertility. *Contraception* 2005;
2 72(4):314-8.
- 3 114. Jafaroghli M, Khalili B, Farshad A, Zamiri MJ. The effect of supplementation of
4 cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen.
5 *Small Rumin Res* 2011; 96:58-63.
- 6 115. Jiménez E, Perez-Marín CC, Vizuite G, Millán, y Agüera EI. Effect of different
7 extenders on in vitro characteristics of feline epididimal sperm during
8 cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 2013; 48(4):665-72.
- 9 116. Jiménez Vaquero EM. Aportaciones a la criopreservación del esperma de felino
10 doméstico: influencia de las soluciones diluyo-conservadoras. Tesis doctoral. Facultad
11 de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España. 2013.
- 12 117. Johnston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. En: *Canine and feline Theriogenology*. WB
13 Saunders. Philadelphia, 2001, p. 287-306.
- 14 118. Jones RC, Stewart DL. The effects of cooling to 5 degrees C and freezing and thawing
15 on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1979; 56(1):233-8.
- 16 119. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli C, de la
17 Sota RL. Ultrastructural analysis of fresh and frozen-thawed dog spermatozoa. 8th
18 Inter American Congress of Electron Microscopy, 2005, La Habana, Cuba.
- 19 120. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli MA. La microscopía electrónica como herramienta en
20 la evaluación de semen canino. *Analecta Veterinaria* 2008; 28(1):7-14.
- 21 121. Kashiwazaki N, Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, Masaoka T,
22 Inomata T. Comparisson of glycerol, lactamide, acetamide and Dimethylsulfoxide as
23 crioprotectants of japanese white rabbit spermatozoa. *J Reprod Dev* 2006; 52(4):511-
24 6.
- 25 122. Kato S, Miyano T, Nanjo I, Yasui T, Kanda S. Effect of concentration of sodium
26 laurylsulfate on motility and acrosome morphology of frozen boar spermatozoa. *Japan*
27 *J Anim Reprod* 1990; 36:26-30.
- 28 123. Kozdrowski R. The effect of trehalose on post-thaw viability and fertility of European
29 Brown hare (*Lepus europaeus Pallas, 1778*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009;
30 116(3-4):326-34.
- 31 124. Lambo CA, Grahn RA, Lyons LA, Bateman HL, Newsom J, WF Swanson.
32 Comparative Fertility of Freshly Collected vs Frozen–Thawed Semen with

- 1 laparoscopic Oviductal Artificial Insemination in Domestic Cats. *Reprod Domest*
2 *Anim* 2012; 47(6):284–8.
- 3 125. Lengwinat T, Blottner S. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat
4 using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1994; 35(3-
5 4):291-301.
- 6 126. Liakatas J, Williams AE, Hargreave TB. Scoring sperm morphology using the
7 scanning electron microscope. *Fertil Steril* 1982; 38(2):227-32.
- 8 127. Liu Z, Foote RH, Brockett CC. Survival of bull sperm frozen at different rates in
9 media varying in osmolarity. *Cryobiology* 1998; 37(3):219-30.
- 10 128. Long JA, Wildt DE, Wolfe BA, Critser JK, De Rossi RV, Howard J. Sperm
11 capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic
12 cats. *Biol Reprod* 1996; 54(3):638-46.
- 13 129. Lopes KRF, Costa LLM, Lima GL, Souza ALP, Silva, AR. Dimethylformamide is no
14 better than Glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 2009;
15 72(5):650-4.
- 16 130. Luvoni CG. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 2006;
17 66(1):101-11.
- 18 131. Macías García B, Ortega Ferrusola C, Aparicio IM, Miró-Morán A, Morillo Rodriguez
19 A, Gallardo Bolanos JM, González Fernandez L, Balso da Silva CM, Rodríguez
20 Martínez H, Tapia JA, Peña FJ. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa:
21 Effect on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial
22 membrane potential. *Theriogenology* 2012; 77(7):1280-9.
- 23 132. Manjunath P, Therien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in
24 sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod*
25 *Immunol* 2002; 53(1-2):109-19.
- 26 133. Mansilla Hermann D, Jurado S, Nuñez Favre R, Stornelli MC, Stornelli MA. (2012).
27 Alteraciones ultramicroscópicas observadas en semen canino (*Cabis lups familiaris*)
28 congelado descongelado. XIII Jornada de Divulgación Técnico-científica, 2012, p191,
29 Santa Fe, Argentina.
- 30 134. Mansilla Hermann D, Tittarelli MC, Nuñez Favre R, Bonaura MC, Stornelli MA.
31 Efecto de disacáridos y detergentes sobre la viabilidad del semen canino congelado-

- 1 descongelado. XII Jornada de Divulgación Técnico-científica, 2011, p 255-6, Santa Fe
- 2 Argentina.
- 3 135. Markova MD. Electron microscopic observations of human sperm whole-mounts after
- 4 extraction for nuclear matrix and intermediate filaments (NM-IF). Int J Androl 2004;
- 5 27(5):291-5.
- 6 136. Martin JC, Klug E, Günzel AR. Centrifugation of stallion semen and its storage in
- 7 large volume straws. J Reprod Fertil Suppl 1979; (27):47-51.
- 8 137. Matzuoka T, Imai H, Kohno H, Fukui Y. Effect of bovine serum albumin and
- 9 trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. J
- 10 Reprod Dev 2006; 52(5):675-83.
- 11 138. Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. Anim
- 12 Reprod Sci 1996; 42(1-4):55-65.
- 13 139. Mazur P, Leibo SP, Farrant J, Chu EHY, Hanna MG, Smith LH. Interactions of
- 14 cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen
- 15 mammalian cells. En: Ciba Foundation Symposium. The Frozen Cell. John Eiley y
- 16 sons, Ltd. Wolstenholme, G.E.W., O'Connor, M. (Eds.), The Frozen Cell, Churchill,
- 17 London, 1970, p 69-88.
- 18 140. Medeiros ASL, Gomes GM, Carmo MT, Papa FO, Alvarenga MA. Cryopreservation
- 19 of stallion sperm using different amides. Theriogenology 2002; 58(2-4):273-6.
- 20 141. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tsarik J. Distinction between true acrosomal reaction
- 21 and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum*
- 22 *agglutinin*. J Reprod Fertil 1992; 95(3):755-63.
- 23 142. Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. Cryobiology 1971;
- 24 8(5):489-500.
- 25 143. Mesa AM, Henao GR. Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros
- 26 pos descongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. Rev MVZ
- 27 Córdoba 2012, 17(1): 2908-15.
- 28 144. Mizutani T, Sumigama S, Nagakubo K, Shimizu N, Oba H, Hori T, Tsutsui T.
- 29 Usefulness of addition of Orvus ES paste and sodium lauryl sulfate to frozen feline
- 30 semen. J Vet Med Sci 2010; 72(1):23-7.
- 31 145. Mocé E, Graham JK. In vitro evaluation of sperm quality. Anim Reprod Sci 2008;
- 32 105(1-2):104-18.

- 1 146. Molinia FC, Evans G, Quintana Caseres PI, Maxwell WMC. Effect of
2 monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome
3 integrity, and fertility of pellets frozen ram spermatozoa. Anim Reprod Sci 1994;
4 36(1-2):113-22.
- 5 147. Mortimer D. *Practical Laboratory Andrology*, Oxford University Press, New York,
6 NY, 1994, p. 393
- 7 148. Morton KM, Evans G, Maxwell WMC. Effect of glycerol concentration, Equex STM[®]
8 supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome
9 integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. Theriogenology
10 2010; 74(2):311-6.
- 11 149. Nagy S, Házas G, Bali-Papp A, Ivancsics J, Sas JRF, Kovács A, Foote RH. Evaluation
12 of sperm tail membrane by light microscopy. Theriogenology 1999; 52(7):1153-9.
- 13 150. Nakatsukasa E, Inomata T, Ikeda T, Shino M, Kashiwazaki N. Generation of live rat
14 offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at
15 196°C. Reproduction 2001; 122(3):463-7.
- 16 151. Nath J. Correlative biochemical and ultrastructural studies on the mechanism of
17 freezing damage to ram semen. Cryobiology 1972; 9(4):240-6.
- 18 152. National Research Council. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.
19 2da. Edición. México. Ed Lomelí, C. Estampa de artes gráficas, 2002.
- 20 153. Nelson KL, Crichton EG, Doty L, Volenec DE, Morato RG, Pope CE, Dresser, BL;
21 Brown, CS; Armstrong, DL, Loskutoff NM. Heterologous and homologous fertilizing
22 capacity of cryopreserved felid sperm: a model for endangered species.
23 Theriogenology 1999; 51(1):290.
- 24 154. Neville WJ, Macpherson JW, King GJ. The contraceptive action of glycerol in gilts. J
25 Anim Sci 1970; 31:227.
- 26 155. Neville WJ; Macpherson JW, Reinhart B. The contraceptive action of glycerol in
27 chicken. Poult Sci 1971; 50(5):1411-5.
- 28 156. Nishizono H, Shioda M, Takeo T, Irie T, Nakagata N. Decrease of fertilizing ability of
29 mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. Biol
30 Reprod 2004; 71(3):973-8.
- 31 157. Nizanski W, Dubiel A, Bielas W, Dejneka GJ. J Reprod. Fertil Suppl. 2001; 57:365-9.

- 1 158. Nuñez Favre R, Bonaura MC, Praderio R, de la Sota RL, Rojas Zamora CA, Stornelli
2 MA. Ocurrencia de anomalías espermáticas en el felino doméstico (*Felis catus*). I
3 Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal, 2011, Viña del Mar. Chile.
- 4 159. Núñez Favre R, Bonaura MC, Tittarelli CM, Mansilla Hermann D, de la Sota RL,
5 Stornelli MA. Effect of natural photoperiod on epididymal sperm quality and
6 testosterone serum concentration in domestic cat (*Felis silvestris catus*). Reprod
7 Domest Anim 2012; 47(6):232-4.
- 8 160. Oettlé EE, Soley JT. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopy
9 study. Vet Med Rev 1988; 59:28-70.
- 10 161. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effect of
11 cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human
12 spermatozoa. J Assist Reprod Genet 2008; 25(8):403-11.
- 13 162. Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes.
14 Theriogenology 1992; 38(2):209-22.
- 15 163. Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar,
16 bull, stallion and rooster sperm membranes. Cryobiology 1992; 29(2):255-66.
- 17 164. Paulens H. The structure and function of the sperm membrane in relation to cold
18 shock. Norw J Vet Med 1993; 105:1135-42.
- 19 165. Pedersen H, Lebech PE. Ultrastructural changes in the human spermatozoon after
20 freezing for artificial insemination. Fertil Steril 1971; 22(2):125-33.
- 21 166. Pedersen H, Fawcett DW. Functional anatomy of the human spermatozoon. In Hafez,
22 E.S.E. (ed.) Human semen and fertility regulation in men. Mosby, St Louis. 1976.
- 23 167. Pegg DE. Principles of cryopreservation. In: Day JG, Stacey GN. Cryopreservation
24 and Freeze-Drying Protocols. 2 ed. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007; 39-58.
- 25 168. Penfold LM, Moore HDM. A new method for cryopreservation of mouse
26 spermatozoa. J Reprod Fertil 1993; 99(1):131-4.
- 27 169. Peña A, Linde-Forsberg C. Effects of Equex, one or two-step dilution, and two
28 freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. Theriogenology
29 2000; 54(6):859-75.
- 30 170. Peña AI, Lugilde LL, Barrio M, Herradon PG, Quintela LA. Effects of Equex from
31 different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration
32 of dog spermatozoa. Theriogenology 2003; 59(8): 1725-39.

- 1 171. Petersen RG. Design and analysis of experiments. Marcel Dekker Inc. New York.
2 1985, p. 314.
- 3 172. Phillips PH, Lardy HA. A Yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. J
4 Dairy Sci 1940; 23:399–404
- 5 173. Pineda MH, Dooley MP. Effect of voltage and order of voltage application on seminal
6 characteristics of electroejaculates of the domestic cat. Am J Vet Res 1984;
7 45(8):1520-5.
- 8 174. Platz CC, Follis T, Demorest N, Seager SWJ. Semen collection, freezing and
9 insemination in the domestic cat. Proceeding o VIII International Congress on Animal
10 Reproduction and Artificial Insemination, Cracow 1976; 1053-6.
- 11 175. Platz CC, Wildt DE, Seager SW. Pregnancy in the domestic cat after artificial
12 insemination with previously frozen spermatozoa. J Reprod Fertil 1978;52(2):279–82.
- 13 176. Plummer JM, Watson PF. The qualitative ultrastructural assessment of head
14 membrane damage in boar spermatozoa subjected to varying degrees of cold shock.
15 Anim Reprod Sci 1988; 16:265-75.
- 16 177. Ponglowhapan S, Chatdarong K. Effect of Equex STM Paste on the quality of frozen-
17 thawed epididymal dog spermatozoa. Theriogenology 2008; 69(6):666-72.
- 18 178. Pope CE, Turner JL, Quatman SP, Dresser BL. Semen storage in the domestic felid a
19 comparison of cryopreservation methods and storage temperatures. Biol Reprod 1991;
20 44(1):117.
- 21 179. Prathalingam NS, Holt WV, Revell SG, Mirczuk S, Fleck RA, Watson PF. Impact of
22 antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw.
23 Theriogenology 2006; 66(8):1894-900.
- 24 180. Ptaszynska, Monika. Compendium de Reproducción animal. Intervet 9º edición, 2007;
25 p. 291-304.
- 26 181. Pukazhenth B, Laroe D, Crosier A, Busch ML, Spindler R, Pelican KM, Busch M,
27 Howard JG, Wildt DE. Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis*
28 *nebulosa*) spermatozoa. Theriogenology 2006; 66(6-7):1790-6.
- 29 182. Pukazhenth B, Pelican K, Wildt D, Howard J. Sensitivity of Domestic Cat (*Felis*
30 *catus*) sperm from Normospermic versus Teratospermic Donors to Cold-Induced
31 Acrosomal Damage. Biol Reprod 1999; 61(1):135-41.

- 1 183. Pukazhenthil B, Spindler R, Wildt D, May Bush L, Howard J. Osmotic properties of
2 spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphisms: influence
3 of adding and removing cryoprotectant. Cryobiology 2002; 44(3):288-300.
- 4 184. Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. Small Rum Res 2006; 63(3):215-
5 25.
- 6 185. Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA. Effect of Orvus ES paste on acrosomal
7 morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. J Anim
8 Sci 1978; 47(1):198-202.
- 9 186. Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL. Interaction of extender composition and
10 incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. J Anim Sci 1972;
11 35(3):580-4.
- 12 187. Pushett DA, Lacham-Kaplan O, Gunn IM, Trounson AO. Intracytoplasmic sperm
13 injection (ICSI) using epididymal sperm and in vitro-matured oocytes in domestic cat:
14 A model for endangered species. Theriogenology 2000; 53:400.
- 15 188. Quan GB, Hong QH, Shao QY, Yang HY, Wu SS. The effects of trehalose and
16 sucrose on frozen spermatozoa of Yunnan semi-fine wool sheep during a non mating
17 season. Cryo letters 2012; 33(4):307-17.
- 18 189. Quinn PJ, White LG, Cleland KW. Chemical and ultrastructural changes in ram
19 spermatozoa after washing, cold shock and freezing. J Reprod Fert 1969; 18:209-20.
- 20 190. Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as
21 related to midpiece abnormalities and motility. Gamete Res 1989; 24(2):127-34.
- 22 191. Reddy S, Mohanarao J, Atreja SK. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-
23 based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following
24 cryopreservation. Anim Reprod Sci 2010; 119(3-4):183-90.
- 25 192. Reichart M, Eltes F, Soffer Y, Zigenreich E, Yogev L, Bartoov B. Andrologia 2000;
26 32:139-45.
- 27 193. Rodrigues da Paz, Regina Cecilia. Wildlife Cats reproductive biotechnology. En:
28 Current frontiers in Cryobiology, 2012, p. 369-88.
- 29 194. Rodríguez-Martínez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C. Fine structure and elemental
30 composition of fresh and frozen dog spermatozoa. J Reprod Fertil 1993; 47: 279-85.

- 1 195. Rota A, Iguerouada M, Verstergen. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog
2 semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM Paste. *Theriogenology*
3 1999; 51(6):1045-58.
- 4 196. Rota A, Linde-Forsberg C. Effect of Equex one or two step dilution, and two freezing
5 and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2000;
6 54(6):859-75.
- 7 197. Rota A, Ström B, Linde-Fosberg C, Rodriguez-Martinez. H. Effect of Equex STM
8 Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38
9 degrees C. *Theriogenology* 1997; 47(5):1093-101.
- 10 198. Rudolph AS, Crowe JH. Membrane stabilization during freezing: the role of two
11 natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 1985; 22(4):367-77.
- 12 199. Salamon S, Wilmut I, Polge C. Deep freezing of boar semen. I. Effects of diluent
13 composition, protective agents, and method of thawing on survival of spermatozoa.
14 *Aust J Biol Sci* 1973; 26(1):219-30.
- 15 200. SAS®. SAS and STAT User's Guide, Release 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC,
16 USA, 2003.
- 17 201. Savignone CA, Gimenez F, Nuñez Favre, R, Tittarelli CM, Stornelli MC, de la Sota
18 RL, Stornelli MA. Comparison of different concentrations of dimethyl formamide on
19 viability of frozen-thawed dog spermatozoa. 17th Brazilian Congress of Animal
20 Reproduction Curitiba, Brasil, 2007b, p. 175.
- 21 202. Savignone CA, Jurado SB, Tittarelli CM, Reyna JC, Stornelli MC, García Mitacek
22 MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Efecto de la trealosa en la estabilización de
23 membranas en espermatozoides caninos criopreservados. IX Jornadas de divulgación
24 técnico-científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias UNR Casilda, 2008, p. 214-5.
- 25 203. Savignone CA, Tittarelli CM, Stornelli MC, Gimenez F, de la Sota RF, Stornelli MA.
26 Criopreservación de semen canino. Aplicaciones y desarrollo. *Veterinaria, Sociedad*
27 *de Medicina Veterinaria del Uruguay*, 2007a; 42(167):15-22.
- 28 204. Schafer S, Holzman A. The use of transmigration and Spermac stain to evaluate
29 epididimal cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2000; 59(3-4):201-11.
- 30 205. Seager SWJ. Electroejaculation of cats (domestic and captive wild felids). En *Applied*
31 *electronics for veterinary medicine and animal physiology*. WR Klemm, CC Thomas
32 (Ed.). Springfield, 1976, p. 410-8.

- 1 206. Siemieniuch M, Dubiel A. Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable
2 temperatures. *Anim Reprod Sci* 2007; 99(1-2):135-44.
- 3 207. Silva A, Fontelle-Neto J, Cardoso R, Silva L, Chirinea V, Lopes M. Description of
4 ultrastructural damage in frozen-thawed canine spermatozoa. *Ciencia Animal*
5 Brasileira 2009; 10(2):595-601.
- 6 208. Silva JNC, Leitaó RM, Lapão NE, Cunha MB, Cunha TP, Silva JP, Paisana FC. Birth
7 of siberian tiger (*Panthera Tigris altaica*) cubs after transvaginal artificial
8 insemination. *J Zoo wil Med* 2000; 31(4):566-9.
- 9 209. Slatter D. Textbook of small animal surgery. In: Saunders W, editor. 2° ed.
10 Philadelphia, 1993; p. 1325-35.
- 11 210. Slavík T. Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with
12 zona-free hamster egg. *J Reprod Fertil* 1987; 79(1):99-103.
- 13 211. Sojka NJ, Jemings LL, Hamner CE. Artificial insemination in the cat (*Felis catus L.*).
14 *Lab Anim Care* 1970; 20(2):198–204.
- 15 212. Squires EL, Keith SL, Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for
16 preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2004; 62(6):1056-65.
- 17 213. Stackecki JJ, Ginsburg KA, Armant DR. Stimulaion of cryopreserved epididymal
18 spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline,
19 and 2'-deoxyadenosine. *J Androl* 1994; 15(2):157-64.
- 20 214. Sterzik K, De Santo M, Uhlich S, Gagsteiger F, Strehler E. Glass wool filtration leads
21 to a higher percentage of spermatozoa with intact acrosomes: an ultrastructural
22 analysis. *Hum Reprod* 1998; 13(9):2506-11.
- 23 215. Storey BT, Noiles EE, Thompson KA. Comparison of glycerol, other polyols,
24 trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm
25 cryopreservation. *Cryobiology* 1998; 37(1):46-58.
- 26 216. Stornelli MA, de la Sota RL. Fertilidad y supervivencia del semen canino
27 criopreservado. *Analecta Veterinaria* 2006; 25(2):29-38.
- 28 217. Stornelli MA, Jurado SB, Savignone CA, Sarmiento P, Tittarelli CM, Stornelli MC, de
29 la Sota RL. Estudios microscópicos y ultramicroscópicos de semen canino fresco y
30 congelado-descongelado con un diluyente tris base con el agregado de trealosa. *Acta*
31 Microscópica 2007; p 194-5.

- 1 218. Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, Nuñez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM,
2 de la Sota RL. Seasonal changes in testis cell morphology in male domestic cats (*Felis*
3 *catus*). Reprod Dom Anim 2009; 44(2):287-90.
- 4 219. Stornelli MA. Basic and advanced evaluation of cat's semen. Brazilian journal of
5 animal reproduction, 2007; 31(1):135-40.
- 6 220. Stornelli MA. Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado.
7 Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
8 2004.
- 9 221. Stornelli MA. Particularices fisiológicas de la reproducción en felinos. Physiological
10 aspects of feline reproduction. Rev Bras Reprod Anim 2007; 31(1):71-6.
- 11 222. Stornelli MA, Savignone CA, Jurado S, Stornelli MC, Tittarelli CM, de la Sota RL.
12 Estudio ultraestructural de semen canino fresco y descongelado. Cong Cs Morf. 2004;
13 p. 48.
- 14 223. Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone C, Jurado S, de la Sota RL. Viability study
15 ultraestructural changes of frozen-thawed dog spermatozoa with different Equex stm
16 paste concentrations. Biotechnonoly/Sperm. 2004; p. 516.
- 17 224. Stornelli MC, Stornelli MA. Evaluación, criopreservación de semen e inseminación
18 artificial en el felino domestico. In: Anuario Asociación Argentina de Medicina
19 Felina. Buenos Aires: AAMeFe, 2002a; p. 87-90.
- 20 225. Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. Efecto de los procesos de
21 criopreservación sobre la fertilidad seminal. Analecta veterinaria 2005; 25(2): 28-35.
- 22 226. Strohemeyer M. Freezing of goat smen with regard to seson, centrifugation and use of
23 detergent. PhD Thesis, 1988.
- 24 227. Ström B, Rota A, Linde-Forsberg C. In vitro characteristics of canine spermatozoa
25 subjected to two methods of cryopreservation. Theriogenology 1997; 48(2):247-56.
- 26 228. Ström Hoist B, Rota A, Andersen-Berg K, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H.
27 Canine sperm head damage after freezing-thawing: Ultrastructural evaluation and
28 content of selected elements. Reprod Dom Anim 1998; 33(2):77-82
- 29 229. Swanson WF. Laparoscopic oviductal embryo transfer and artificial insemination in
30 felids-challenges, strategies and successes. Reprod Dom Anim 2012; 47(6):136-40.

- 1 230. Sztein JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE. Comparison of permeating and
2 nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 2001;
3 42(1):28-39.
- 4 231. Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Hori T, Tsutsui T. Artificial
5 intravaginal insemination using fresh semen in cats. *J Vet Med Sci* 2000; 62
6 (11):1163–7.
- 7 232. Tasseron F, Amir D, Schindler H. Acrosome damage of ram spermatozoa during
8 dilution, cooling and freezing. *J Reprod Fertil* 1977; 51(2):461-2.
- 9 233. Tebet JM, Martins MIM, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD.
10 Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated
11 spermatozoa. *Theriogology* 2006; 66(6-7):1629-32.
- 12 234. Tekin N. Insemination of sheep with frozen semen: effect of different diluents on
13 motility, acrosome integrity and Sephadex filtration of spermatozoa processed in mini-
14 straws. PhD Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, 1982.
- 15 235. Thuwanut P, Axner E, Johannisson A, Chatdarong K. Detection of Lipid Peroxidation
16 Reaction in Frozen-Thawed Epididymal Cat Spermatozoa Using BODOPY(581/591)
17 C11. *Reprod Domest Anim* 2009; 44(2):373-6.
- 18 236. Thuwanut P, Chatdarong K, Techakumphu M, Axner E. The effect of antioxidants on
19 motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal
20 cat spermatozoa. *Theriogenology* 2008; 70(2):233-40.
- 21 237. Thuwanut P, Chatdarong K. Incubation of Post-Thaw Epididymal Cat Spermatozoa
22 with Seminal Plasma. *Reprod Domest Anim* 2009; 44(2):381-4.
- 23 238. Tittarelli CM, Jurado SB, Núñez Favre R, Bonaura MC, de la Sota RL RL, Stornelli
24 MA. Effect of storage media and storage time on histological and ultrastructural
25 changes in cat epididymal cells. *Reprod Domest Anim* 2012; 47(6):281-3.
- 26 239. Tittarelli CM, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli, MA, de la Sota RL.
27 Effect of transport media and storage time on survival of spermatozoa recovered from
28 canine and feline epididymides. *Theriogenology* 2006; 66(6-7):1637-40.
- 29 240. Tonieto RA, Goularte KL, Gastal GDA, Schiavon RS, Deschamps JC, Lucia Jr. T.
30 Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen
31 ram semen. *Small Rumin Res* 2010; 93:206-9.

- 1 241. Toyonaga M, Sato Y, Sasaki A, Kaihara A, Tsutsui T. Artificial insemination with
2 cryopreserved sperm from feline epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 2011;
3 76(3):532-7.
- 4 242. Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E. Comparison of cryoprotectants and methods of
5 cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult Sci* 1999; 78(4):586-90.
- 6 243. Tsutsui T, Mizutani T, Matsubara Y, Toyonaga M, Oba H, Hori T. Surgical
7 intrauterine insemination with cat semen cryopreserved with Orvus ES Paste or
8 Sodium Lauryl Sulfate. *J Vet Med Sci* 2011; 73(2):259-62.
- 9 244. Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori
10 T. Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats. *J Vet Med Sci*
11 2000a; 62(12):1241-5.
- 12 245. Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori
13 T. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *J Vet Med Sci*
14 2000b; 62(12):1247-51.
- 15 246. Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T. Artificial insemination with frozen epididimal
16 sperm in cats. *J Vet Med Sci* 2003; 65(3):397-9.
- 17 247. Tsutsui T. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology* 2006;
18 66(1):122-5.
- 19 248. Uysal O, Bucak MN. The role of different trehalose concentrations and cooling rates is
20 freezing of ram semen. *Ankara Univ Vet Fak Derg* 2009; 56:99-103.
- 21 249. Varela Junior AS, Corcini CD, Gheller SMM, Jardim RD, Lucia Jr, Streit DP,
22 Figueiredo MRC. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of
23 tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology* 2012; 78(2):244-51.
- 24 250. Vargas A, Sánchez I, Godoy J, Roldán E, Martínez F, Simón MA. Plan de Acción para
25 la cría en cautividad del lince ibérico: Cuarta edición. (Iberian Lynx Captive Breeding
26 Action Plan: Fourth Edition). Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, 2007.
- 27 251. Vick MM, Bateman HL, Lambo CA, Swanson WF. Improved cryopreservation of
28 domestic cat sperm in a chemically defined medium. *Theriogenology* 2012; 78(9):
29 2120-8.
- 30 252. Vidament M, Daire C, Yvon JM, Doligez P, Bruneau B, Magistrini M, Ecot P.
31 Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl
32 formamide. *Theriogenology* 2002; 58(2-4):249-51.

- 1 253. Villaverde Silva Balbin AI, Fioratti EG, Penitenti M, Ikoma MRV, Tsunemi MH,
2 Papa FO, Lopes MD. Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on
3 domestic cat spermatozoa. *Theriogenology* 2013; 80(7):730-7.
- 4 254. Villaverde Silva Balbin AI, Mello Martins MI, Bastro Castro V, Lopes MD.
5 Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic
6 feline Epididymides (*Felis catus*). *Theriogenology* 2006; 66(6-7):1641-4.
- 7 255. Voelkel SA, Hu Y. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos
8 allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females.
9 *Theriogenology* 1992; 37(3):687-97.
- 10 256. Watson PF, Duncan AE. Effect of salt concentration and unfrozen water on the
11 viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology* 1988; 25(2):131-42.
- 12 257. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa
13 and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(4):871-
14 91.
- 15 258. Watson PF. The effects of cold shock on sperm cell membrane. En: Morris GJ, Clark
16 A, editores. *Effects of low temperatures on biological membranes*. Academic Press,
17 London 1981; p.189-218.
- 18 259. Watson PF. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein
19 fraction of egg yolk during storage at 5° C and deep-freezing. *J. Thermal Biol* 1976;
20 1(3):137-41.
- 21 260. Watson PF. The preservation of semen in mammals. In: *Oxford reviews of*
22 *Reproductive Biology*. CA: Finn Eds. Oxford, Oxford University Press. 1979;
23 7:283-350.
- 24 261. White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and
25 preservation: review. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5(6):639-58.
- 26 262. White LG, Darin-Bennett. The lipids of sperm in relation to cold shock. *Proc. 8th Int.*
27 *Congr. Anim. Reprod. & A.I. Krakow*, 1976; p. 951-4.
- 28 263. Wildt DE, Bush M, Goodrowe KL, Packer C, Pusey AE, Brown JL, Joslin P, O'Brien
29 SJ. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations.
30 *Nature* 1987; 329:328-31.

- 1 264. Wildt DE, Monfort SL, Donoghue AM, Johnston LA, Howard J. Embryogenesis in
2 conservation biology-or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology*
3 1992; 37:161-84.
- 4 265. Wildt DE. Endangered species spermatozoa: diversity, research and conservation. In:
5 Bartke A ed. *Functions of Somatic Cells in the Testis*. New York: Springer-Verlag,
6 1994; 1-24.
- 7 266. Wilmut I, Polge C. The fertilizing capacity of boar semen stored in the presence of
8 glycerol at 20, 5 and -79 degrees C. *J Reprod Fertil* 1974; 38(1):105-13.
- 9 267. Woelders H, Matthijs A, Engel B. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the
10 freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after
11 freezing and thawing. *Cryobiology* 1997; 35(2):93-105.
- 12 268. Wood TC, Swanson WF, Davis RM, Anderson JE, Wildt DE. Functionality of sperm
13 from normo versus teratospermic domestic cats cryopreserved in pellets or straw
14 containers. *Theriogenology* 1993; 39:342.
- 15 269. Woolley DM, Richardson DW. Ultrastructural injury to human spermatozoa after
16 freezing and thawing. *J Reprod Fert* 1978; 53(2):389-94.
- 17 270. Yamashiro H, Narita K, Sugimura S, Han YJ, Suagwara A, Morohaku K, Nakazato F,
18 Konno T, Yoshida M, Sato E. Trehalose enhanced the freezability of poodle dog
19 sperm collected by artificial vagina (AV). *Anim Reprod Sci* 2007; 102(1-2):165-71.
- 20 271. Yanagimachi R, Noda YD. Ultrastructural changes in the hamster sperm head during
21 fertilization. *J Ultrastruc Res* 1970; 31(5-6):465-85.
- 22 272. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: *Physiology of reproduction*, E. Knobil,
23 JD. Neil, (Eds.). Raven Press, New York, 1994; pp. 189-317.
- 24 273. Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. Influence of sugar supplementation of the
25 extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during
26 freezing. *Theriogenology* 2000; 54(4):579-85.
- 27 274. Yu I, Leibo SP. Recovery of motile, membrane intact spermatozoa from canine
28 epididymides stored for 8 days at 4 degrees C. *Theriogenology* 2002; 57(3):1179-90.
- 29 275. Zambelli D, Buccioli M, Castagnetti C, Belluzzi S. Vaginal and cervical anatomic
30 modifications during the oestrus cycle in relation to transcervical catheterization in the
31 domestic cat. *Reprod Domest Anim* 2004; 39(2):76-80.

- 1 276. Zambelli D, Canepperle B, Castagnetti C, Belluzzi S. Cryopreservation of cat semen
2 in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Domest Anim* 2002,
3 37(5): 310-3.
- 4 277. Zambelli D, Cunto M. Semen collection in cats: Techniques and análisis.
5 *Theriogenology* 2006; 66(2):159-65.
- 6 278. Zambelli D, Iacono E, Raccagni R, Merlo B. Quality and fertilizing ability of
7 electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste.
8 *Theriogenology* 2010b; 73(7):886-92.
- 9 279. Zambelli D. Study of sperm morphology and preservation in the cat and of
10 reproductive physiologic parameters in the female for the use in the AI. PhD tesis,
11 University of Perugia, 1994; p 69-70.
- 12 280. Zambelli D, Raccagni R, Cunto M, Andreani G, Isani G. Sperm evaluation and
13 biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and
14 urethral catheterization. *Theriogenology* 2010a; 74(8):1396-402.
- 15 281. Zamboni L. Physiology and pathophysiology of the human spermatozoon: the role of
16 electron microscopy. *J Electron Microsc Tech* 1991; 17(4):412-36.
- 17 282. Zamboni L. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of
18 infertility: the role of electron microscopy on the evaluation of semen quality. *Fertile*
19 *Steril* 1987; 48(5):711-34.
- 20 283. Zhang JJ, Boyle MS, Smith CA, Moore HDM. Acrosome reaction of stallion
21 spermatozoa evaluated with monoclonal antibody and zona-free hamster egg. *Mol*
22 *Reprod Dev* 1990; 27(2):152-8.

BIOGRAFÍA PERSONAL

La Médica Veterinaria María Candela Bonaura nació en la ciudad de Necochea el 23 de Julio de 1984. Realizó sus estudios de Educación General Básica en la Escuela Faustino Sarmiento N°2 y sus estudios de Polimodal en el Colegio Nuestra Señora de Nueva Pompeya de la ciudad de Necochea. Ingresó a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP en Febrero de 2003 y obtuvo el título de Médica Veterinaria en Diciembre de 2009. Recibió la distinción de Mejor Promedio de la Promoción 2008 de Médicos Veterinarios de la FCV-UNLP.

En el año 2006 ingresó como Colaboradora en la Cátedra y Servicio de Reproducción Animal en el Área de Pequeños Animales, y luego a partir de su graduación pasó a ser Ayudante Diplomado *ad honorem*. Durante su paso por la UNLP también desempeñó funciones docentes en la Cátedra de Patología General como ayudante alumno *ad honorem* y en la Cátedra de Clínica de Pequeños Animales como Adscripta. Actualmente se desempeña como Ayudante Diplomado *ad honorem* en el Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal en el Hospital de Pequeños Animales de la UNLP, en el área de Clínica Reproductiva.

En el año 2009 fue becada por concurso de la UNLP para iniciar tareas de investigación en una beca para alumnos universitarios. Luego fue becada por concurso de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires-CIC para continuar con sus primeros pasos en la investigación a través de una Beca de Entrenamiento para alumnos. Más tarde se le otorgó una Beca de Estudio de la CIC para comenzar sus estudios de postgrado e iniciar así el Doctorado en Ciencias Veterinarias, estudios que pudo continuar con la obtención de una Beca de Perfeccionamiento de la CIC y una Beca Postgrado Tipo II del

1 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-CONICET para realizar su
2 trabajo de tesis doctoral.

3 Reconociendo la imperiosa necesidad de la especialización, la mencionada
4 profesional, en el año 2006 comenzó a trabajar en el área de Reproducción de Pequeños
5 Animales, área en la que desde entonces ha desarrollado tareas dictando numerosos cursos a
6 profesionales y publicando varios trabajos científicos y divulgación técnica.

7 En 2009, comenzó a desarrollar su actividad en investigación como Docente
8 Investigadora del Programa de Incentivos, y más tarde, en 2010, comenzó a desarrollar su
9 Tesis Doctoral en ésta Facultad bajo la dirección de la Dra. María Alejandra Stornelli y la
10 codirección de la Dra. Romina de los Angeles Nuñez Favre Romina en la Catedra y el
11 Servicio de Reproducción Animal.

12 Una vez finalizada ésta tesis, continuará con su labor de docencia e investigación
13 sobre el conservación espermática y reproducción en pequeños animales en la Catedra y el
14 Servicio de Reproducción Animal en el Área de Pequeños Animales con una beca Posdoctoral
15 de CONICET bajo la direccion de la Dra. Maria Alejandra Stornelli.